

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA
FACULTADE DE ÓPTICA E OPTOMETRÍA
Departamento de Cirurxía e Especialidades Médico-Cirúrxicas**



**PARTICIPACIÓN DE LA INMUNIDAD INNATA EN LA
PROGRESIÓN DEL QUERATOCONO: ESTUDIO TISULAR EN
QUERATOCONOS UNILATERALES**

**TESIS DOCTORAL
María de las Mercedes Malfeito Jiménez**

2017





La **Prof^a. M^a Isabel Lema Gesto**, Profesora Titular del Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Santiago de Compostela e investigadora principal del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), y el **Dr. Tomás Sobrino Moreiras**, Investigador Miguel Servet del Laboratorio de Investigación de Neurociencias Clínicas del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS) y Colaborador Docente de la Universidad de Santiago de Compostela en el área de conocimiento de Medicina,

CERTIFICAN

Que **Dña. María de las Mercedes Malfeito Jiménez** ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo ***"PARTICIPACIÓN DE LA INMUNIDAD INNATA EN LA PROGRESIÓN DEL QUERATOCONO: ESTUDIO TISULAR EN QUERATOCONOS UNILATERALES"***. Una vez revisado el mismo, manifestamos nuestra conformidad para su presentación y defensa como tesis para optar al grado de doctor, considerando que reúne los requisitos exigidos en el artículo 34 del reglamento de Estudios de Doctorado, y que como Directores de la misma no incurre en las causas de abstención establecidas en la ley 40/2015.

En Santiago de Compostela, febrero de 2017

Fdo. Prof^a. M^a Isabel Lema Gesto

Fdo. Dr. Tomás Sobrino Moreiras





Este trabajo ha sido financiado con subvenciones concedidas por: el Ministerio de Economía y Competitividad a través del Instituto de Salud Carlos III (PI14/00247 y CP12/03121); Xunta de Galicia (Consellería de Economía e Industria: 10 PX113918156PR y Consellería de Educación: GRC2014/027) y el Programa FEDER de la Unión Europea.





A mi familia, en especial a mis padres, porque siempre me han apoyado en todas mis locuras.



AGRADECIMIENTOS

“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber” Albert Einstein. Esto podría explicar porque una chica decide embarcarse, sin ayuda económica, en un estudio apasionante, que inició mucho antes de que se diera cuenta. Y es así como yo lo ví, aunque se hizo duro compaginar una vida de trabajo con una búsqueda incesante del descubrir y del saber. “La raza humana necesita un desafío intelectual. Debe ser aburrido ser Dios, y no tener nada que descubrir” Stephen Hawking.

He contado con muchas ayudas para la realización de la Tesis Doctoral. Debo mencionar en primer lugar a mis directores de tesis, que consiguen hacer de su trabajo una pasión y lo transmiten a los demás; la **Dra. Isabel Lema**, gracias a su paciencia, su dedicación, su criterio y su aliento, ha conseguido hacer fácil lo difícil. Ha sido un privilegio tenerla de guía, de ayuda, de compañera y sobre todo de amiga y al **Dr. Tomás Sobrino** por su capacidad de resolución, sus conocimientos, sus orientaciones y su forma de trabajar, los cuales han sido necesarios para mi formación como investigadora. A su manera, ha sido capaz de ganarse mi lealtad y admiración.

También quiero agradecer a todos los miembros del Instituto Galego de Oftalmoloxía (INGO), **Copena, Consuelo, Belén, Pedro, Mirian, Jesús, Oscar y Gema** por el afecto y estímulo que me han dado siempre. Un cariño especial al **Dr. Elío Díaz-Feijoo**, que ha mostrado tener una paciencia sin límites; y que siguiendo los pasos del **Prof. Sánchez Salorio** ha sabido apoyar proyectos de investigación que aportan conocimientos en el campo de la oftalmología, permitiéndonos su realización en dichas instalaciones. Igualmente, al equipo del Laboratorio de Investigación en Neurociencias Clínicas (LINC), **María, Alba, José, Andrés, Ramón y Esteban** por sus horas de trabajo en este proyecto. Al **Prof. Castillo** que ha influido en muchas de nuestras decisiones. Esta tesis no sería posible sin estos dos grandes centros de investigación.

Y por último y no menos importante, una frase de Mafalda; “Y no será que en este mundo cada vez hay más gente y menos personas”. Puede que esta frase que leí en mi infancia me haya hecho ver la suerte que he tenido siempre en mi camino. A mis compañeros y amigos, en especial a **José Luís Mato** y **Uxía Regueiro**, por su apoyo incondicional. A **Emilio Villar** por su paciencia y cariño. Duros momentos se recuerdan desde el principio hasta el final, pero no llegan a ensombrecer la gratificación y los buenos momentos que te llevas. Seguro que me dejo a más personas en el camino sin nombrar, como mi informático particular **Alonso Cano**, mi gran amiga **Rebeca García, Ángela Ramallo, María Hernánsanz, Nazaret Cao, Mamen Gómez, Inma Lozano, a todos mis compañeros de trabajo**, etc. A todos ellos GRACIAS de todo corazón.





" Un experto es una persona que ha cometido todos los errores que se pueden cometer en un determinado campo"

Niels Henrik David Borh.



ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ADN Ácido desoxirribonucleico.

Ag Antígeno.

AK Quinasa asociada, (del inglés; associated kinase).

ARN Ácido ribonucleico.

ARNm Ácido ribonucleico mensajero.

AV Agudeza visual.

BD Becton, Dickinson and Company.

BCR Receptor de los linfocitos B.

CD14 Cluster de diferenciación 14, (del inglés; cluster of differentiation 14).

cFn Fibronectina celular, (del inglés; cellular fibronectin).

CHUS Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela.

CLEK Evaluación longitudinal en colaboración del queratocono, (del inglés; collaborative longitudinal evaluation of keratoconus).

COX-2 Ciclooxygenasa-2.

D Dioptrías ópticas.

DMP Degeneración marginal pelúcida.

FBS Suero Bovino Fetal (del inglés; Fetal bovine serum).

FITC Isotiocianato de fluoresceína, (del inglés; Fluorescein IsoTioCyanate).

HSP Proteína de choque térmico, (del inglés; heat shock protein).

I-S Diferencia en la curvatura entre puntos inferiores y superiores.

ICAM-1 Molécula de adhesión intercelular-1, (del inglés; intercellular adhesion molecule 1).

IFN Interferon.

Ig Inmunoglobulina.

IGKC Cadena Kappa de la Inmunoglobulina G (del inglés; Immunoglobulin G kappa constant).

IKK Inhibidor de la Quinasa del Factor nuclear Kappa-B (del inglés; inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase).

IL Interleucina.

IL-1R (TIR) Receptor de la interleucina-1.

INGO Instituto Galego de Oftalmoloxía.

iNOS Óxido nítrico sintasa inducible, (del inglés; inducible nitric oxide synthase).

IRAK Quinasa asociada al IL-1R.

K1 Queratometría más plana.

K2 Queratometría más curva.

KLF6 Factor de transcripción de la familia krüppel, (del inglés; krüppel-like factor 6).

Kmax Queratometría máxima.

KPI Índice de predicción de queratocono, (del inglés, Keratoconus Prediction Index).

KSS Escala de gravedad del queratocono, (del inglés; Keratoconus Severity Score).

LAK Célula linfoide derivada de las células NK, (del inglés; lymphokine-activated killer).

LASIK Cirugía refractiva con láser para la corrección de errores refractivos, (del inglés; laser assisted in situ keratomileusis).

LC Lente de contacto.

LCR Lente de contacto rígida.

Lf Lactoferrina.

LH Lámpara de hendidura.

LINC Laboratorio de Investigación en Neurociencias Clínicas.

LPS Lipopolisacáridos.

MAPK Proteína de quinasas activadas por mitógenos, (del inglés; Mitogen Activated Protein Kinases).

MMP Metaloproteasa de la matriz, (del inglés; matrix metalloproteinases).

MT1-MMP membrana tipo 1 de MMP (del inglés; membrane type 1-matrix metalloproteinase 1).

MyD88 Gen de respuesta primaria de diferenciación mieloides 88, (del inglés; myeloid differentiation primary response gene 88).

NF- κ B Factor de transcripción nuclear kappa beta, (del inglés; nuclear factor – κ B).

NGF Factor de crecimiento neural, (del inglés; nerve growth factor).

NGFR Receptor del factor de crecimiento neural, (del inglés; nerve growth factor receptor).

NK Naturaleza asesina, (del inglés; Natural killer).

NLR Receptores NOD-Like, (del inglés NOD-Like receptors).

OPG Osteoprotegerina.

p75NTR Receptor de la neurotrofina p75, (del inglés; p75 neurotrophin receptor).

PAMPs Patrones moleculares asociados a patógenos, (del inglés; pathogen-associated molecular patterns).

PBS Tampón fosfato salino, (del inglés; phosphate buffered saline).

PCR Proteína "C" reactiva.

PDC Poder dióptrico central.

PE anti-human Anticuerpo de los receptores Toll-like 4 (TLR4).

PI 3K-Akt Fosfatidilinositol 3-Quinasa – Quinasa serina/Treonina, (del inglés; Phosphatidylinositol 3-kinase - a serine/threonine kinase).

PMN Células polimorfonucleares.

PRK Queratectomía fotorrefractiva.

PRRs Receptores de reconocimiento de patrones (del inglés; pattern recognition receptors).

QC Queratocono.

QP Queratoplastia.

RGP Rígida gas permeable.

RI Respuesta inflamatoria.

RIG-1-like Receptores RIG-I-like, (del inglés; RIG-I-Like receptors).

RMS Valor cuadrático medio.

RNS Especies reactivas de nitrógeno, (del inglés; reactive nitrogen species).

ROS Especies reactivas de oxígeno, (del inglés; reactive oxygen species).

S100A4

SOD1 Superóxido dismutasa 1, (del inglés; superoxide dismutase 1).

Sp1-Sp3 Factores de transcripción Sp1-Sp3.

TCD4⁺ Cúmulo de diferenciación 4 expresada en la superficie de las células T, (del inglés; cluster of cuadruple differentiation of cells T).

TCR Receptor de los linfocitos T, (del inglés; receptor lymphocytes T).

TGF Factor trasformador de crecimiento, (del inglés; transforming growth factor-B).

Th1-Th2 Linfocitos T colaborador 1/2, (del inglés; T helper 1/2).

TIMP Inhibidores tisulares de las metaloproteasas, (del inglés; metalloproteinase inhibitor).

TIR Toll/IL-1R.

TLR Receptor toll-like, (del inglés; toll-like receptor).

TNF Factor de necrosis tumoral, (del inglés; tumoral necrosis factor).

TRAF6 Proteína transformadora de la tirosina quinasa-6, (del inglés; transforming tyrosine kinase protein-6).

TrKA Transformación de la proteína tirosina quinasa, (del inglés; transforming tyrosine kinase protein).

UAF Unidades arbitrarias de fluorescencia.

VCAM Molécula de adhesión celular vascular, (del inglés; vascular cell adhesion molecule).

VIH Virus de la inmunodeficiencia humana.

VQ Videoqueratoscopio.

ZAG Zinc- α 2-glicoproteína, (del inglés; zinc- α 2-glycoprotein).



Implicación de la inmunidad innata en la progresión del queratocono: estudio tisular en queratoconos unilaterales.

RESUMEN

El queratocono (QC) es una enfermedad progresiva que afecta a adultos jóvenes produciendo discapacidad visual, con gran impacto socio-sanitario y sin tratamiento médico. Tanto la etiología como los factores que condicionan su progresión, siguen sin estar claros. Estudios previos demostraron la implicación de los mecanismos de inflamación en la patogenia y progresión de la ectasia. Debido a ello, postulamos que la inmunidad innata puede estar implicada en el inicio y progresión del QC. El objetivo principal de la tesis fue demostrar, a nivel tisular (epitelio conjuntival y corneal), en pacientes con QC unilateral, la posible participación de la inmunidad innata en la patogenia del QC y su relación con la aparición y progresión del mismo; estudiando los niveles de los receptores toll-like-2 (TLR2) y toll-like-4 (TLR4). Los resultados demuestran que los niveles de TLR2 y TLR4 en células epiteliales de córnea y conjuntiva están sobreexpresados en el QC en relación con el subclínico y control, demostrando la posible implicación de la inmunidad innata en la fisiopatología del QC.

PALABRAS CLAVE: Inflamación, inmunidad innata, lactoferrina (Lf), queratocono unilateral, receptores toll-like (TLRs).

Implicación da inmunidade innata na progresión do queratocono: estudo de tecidos nos queratoconos unilaterais.

RESUMO

O queratocono (QC) é unha enfermidade progresiva que afecta a adultos novos producindo unha discapacidade visual, con gran impacto socio-sanitario e sen tratamento médico. Tanto a etioloxía como os factores que inflúen na súa progresión, permanecen escuros. Estudos anteriores demostraron a implicación dos mecanismos inflamatorios na patoxénese e progresión da ectasia. Como resultado, postulamos que a inmunidade innata pode estar implicada na iniciación e progresión do QC. O principal obxectivo da tese é demostrar, ao nivel do tecido (conxuntiva e epitelio da cornea), en pacientes con QC unilateral, a posible implicación da inmunidade innata na patoxénese do QC e a súa relación coa aparición e progresión do mesmo; estudando os niveis dos receptores toll-like-2 (TLR2) e Toll-like-4 (TLR4). Os resultados demostran que os niveis de TLR2 e TLR4 en células epiteliais da córnea e conxuntiva están maiormente expresados en QC en relación co subclínico e control, demostrando a posible implicación da inmunidade innata na fisiopatoloxía do QC.

PALABRAS CHAVES: Inflamación, inmunidade innata, lactoferrina (Lf), queratocono unilateral, receptores toll-like (TLRs).

Involvement of innate immunity in the progression of keratoconus: Tissue study in unilateral keratoconus.

SUMMARY

Keratoconus (KC) is a progressive disease that affects young adults producing to disability visual, with a great health impact and without medical treatment. Both the etiology and the factors that influence its progression, remain unclear. Previous studies have demonstrated the involvement of inflammatory mechanisms in the pathogenesis and ectasia progression. As a result, we postulate that innate immunity may be involved in the initiation and progression of KC. The main objective of this thesis was to demonstrate, at tissue level (conjunctival and corneal epithelium), in patients with unilateral KC, the possible involvement of innate immunity in the pathogenesis KC and its relation to the occurrence and progression of the same; studying the expression levels of toll-like-2 (TLR2) and Toll-like-4 (TLR4) receptor. The results showed that TLR2 and TLR4 levels in corneal and conjunctival epithelial cells were more expressed in QC than in subclinical and control, demonstrating the possible implication of innate immunity in the pathophysiology of QC.

KEYWORDS: Inflammation, innate immunity, unilateral keratoconus, lactoferrin (Lf), toll like receptors (TLRs).



ÍNDICE GENERAL

I) INTRODUCCIÓN	27
1.1. QUERATOCONO	27
1.1.1. Etiología	29
<i>1.1.1.1. Predisposición genética</i>	<i>29</i>
<i>1.1.1.2. Historia de alergia</i>	<i>30</i>
<i>1.1.1.3. Influencia hormonal y ciertas enfermedades sistémicas/oculares</i>	<i>30</i>
<i>1.1.1.4. Picor y frotamiento ocular</i>	<i>30</i>
<i>1.1.1.5. Porte de lentes de contacto</i>	<i>31</i>
1.1.2. Semiología	31
<i>1.1.2.1. Adelgazamiento corneal</i>	<i>31</i>
<i>1.1.2.2. Nervios corneales</i>	<i>32</i>
<i>1.1.2.3. Anillo de Fleischer</i>	<i>33</i>
<i>1.1.2.4. Estrías de Vogt</i>	<i>33</i>
<i>1.1.2.5. Cicatrices corneales</i>	<i>34</i>
1.1.3. Diagnóstico	34
1.1.4. Clasificación	35
<i>1.1.4.1. Clasificación según su origen</i>	<i>36</i>
<i>1.1.4.2. Clasificación según su configuración</i>	<i>36</i>
<i>1.1.4.3. Clasificación queratométrica-topográfica</i>	<i>36</i>
<i>1.1.4.4. Clasificación morfológica</i>	<i>37</i>
1.1.5. Tratamiento	38
<i>1.1.5.1. Tratamiento óptico</i>	<i>38</i>

1.1.5.2. Tratamiento quirúrgico	39
1.2. QUERATOCONO FUSTRE, SUBCLÍNICO O SOSPECHA DE QUERATOCONO	40
1.2.1. Diagnóstico	42
1.2.2. Reconocimiento de patrones típicos topográficos	42
1.2.2.1. Patrón en pajarita asimétrico, patrón en J y en J invertido	43
1.2.2.2. Patrón en D vertical	43
1.2.2.3. Patrón en pata de cangrejo	44
1.2.3. Índices cuantitativos	44
1.3. BIOMECÁNICA Y QUERATOCONO	45
1.3.1. Microscopio confocal	45
1.3.1.1. Ex vivo	45
1.3.1.2. In vivo	46
1.4. SISTEMA INMUNOLÓGICO E INFLAMACIÓN EN LA SUPERFICIE OCULAR	47
1.4.1. Inflamación aguda	48
1.4.2. Inflamación crónica	48
1.4.3. Mediadores inflamatorios que mantienen la RI	49
1.4.4. Mediadores que contribuyen a la respuesta inmunitaria e inflamatoria	49
1.4.4.1. Citocinas	49
1.4.4.2. Proteasas de la matriz extracelular	51
1.4.4.3. Receptores Toll-Like	52
1.4.4.4. Control de la respuesta inflamatoria	57
1.5. FISIOPATOLOGÍA DEL QUERATOCONO. ESTADO ACTUAL	57
1.5.1. Inflamación	58
1.5.2. Destrucción de la matriz extracelular	58
1.5.3. Daño por estrés oxidativo	59

1.5.4. Apoptosis	59
1.5.5. Factores Genéticos	60
1.6. ESTUDIO DE BIOMARCADORES ASOCIADOS AL QC	60
1.6.1. Genes codificadores del colágeno	61
1.6.2. Metaloproteasas de Matriz y sus inhibidores	61
1.6.3. Biomarcadores inflamatorios y asociados a inmunidad	63
1.6.4. Factores tróficos y estrés oxidativo	63
II) JUSTIFICACIÓN	67
III) HIPÓTESIS	71
IV) OBJETIVOS	75
V) MATERIAL Y MÉTODO	78
5.1. DISEÑO Y PACIENTES DEL ESTUDIO CLÍNICO	78
5.2. CRITERIOS DE SELECCIÓN	78
5.2.1. Criterios de inclusión	78
5.2.1.1. <i>Grupo control</i>	78
5.2.1.2. <i>Queratocono subclínico</i>	79
5.2.1.3. <i>Queratocono manifiesto</i>	80
5.2.2. Criterios de exclusión	80
5.3. DESCRIPCIÓN DE PARÁMETROS ANALIZADOS Y TÉCNICAS	80
5.3.1. Historia y exploración clínica	80
5.3.2. Evaluación topográfica de la córnea	82
5.3.2.1. <i>Evaluación topográfica y aberrométrica</i>	82
5.3.2.2. <i>Evaluación topográfica y tomográfica</i>	82
5.3.3. Evaluación molecular y celular	83

5.3.3.1. Recogida de lágrima	83
5.3.3.2. Extracción de células epiteliales corneales y conjuntivales	83
5.3.3.3. Determinación TLR2 y TLR4	84
5.3.3.4. Análisis de Lf y cFn	84
5.4. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO MUESTRAL	85
5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	85
VI) RESULTADOS	89
6.1. RESULTADOS DEL ESTUDIO	89
6.1.1. Análisis descriptivo	89
6.1.2. Análisis de la variable principal : expresión de TLRs	91
6.1.3. Análisis predictivo de riesgo de inicio y progresión de QC	93
6.1.4. Análisis variables secundarias: progresión QC	96
6.1.5. Análisis variables secundarias: correlación entre TLRs y Lf/cFn	97
6.1.6. Análisis variables secundarias: correlación entre TLRs y tiempo desde el diagnóstico del QC	98
VII) DISCUSIÓN	101
7.1. VARIABLES EPIDEMIOLÓGICAS, CLÍNICAS Y TOPOGRÁFICAS	101
7.2. TLRs Y LIGANDOS ENDÓGENOS	105
7.3. ASOCIACIÓN ENTRE TLRs, LIGANDOS ENDÓGENOS, LF Y EVOLUCIÓN DEL QC	110
7.4. LIMITACIONES DEL ESTUDIO	110
7.5. PERSPECTIVAS FUTURAS	111
VIII) CONCLUSIONES	115
IX) REFERENCIAS	119
X) ANEXOS	137

I) INTRODUCCIÓN

II) JUSTIFICACIÓN

III) HIPÓTESIS

IV) OBJETIVOS

V) MATERIAL Y MÉTODO

VI) RESULTADOS

VII) DISCUSIÓN

VIII) CONCLUSIONES

IX) REFERENCIAS

X) ANEXOS





INTRODUCCIÓN

1.1. QUERATOCONO

El queratocono (QC) se ha definido durante mucho tiempo como la entidad en la cual la córnea adquiere una forma cónica como resultado de un adelgazamiento progresivo no inflamatorio.¹ La alteración de la curvatura corneal da lugar a un astigmatismo irregular con o sin miopía. El diagnóstico del QC es clínico,² y como tal, está basado en la presencia de los signos clínicos de la enfermedad (**Figura 1**).

Aunque tradicionalmente se ha considerado una enfermedad no inflamatoria, estudios recientes demuestran la implicación en el QC de moléculas proinflamatorias como las interleucinas (ILs) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), cuya expresión se encuentra elevada en lágrima.³ Así, este concepto clínico se ha quedado obsoleto con el desarrollo de nuevas tecnologías que permiten caracterizar molecularmente a la enfermedad.

Actualmente el QC se define como una enfermedad inflamatoria degenerativa que provoca una ectasia progresiva de la córnea, originando una gran disminución de la visión, que requiere de queratoplastia (QP) en los casos más avanzados.⁴ Suele afectar a los dos ojos, pero en algunos casos es unilateral. La incidencia se estima en 1 a 2.000 en la población general, pero con el descubrimiento de la topografía empezó a tener un mejor diagnóstico, lo que hace también que la prevalencia se incremente.⁵ En poblaciones asiáticas este valor se multiplica x 4. Su prevalencia es de 0.004% a 0.6% (54.5 por 100.000).⁶ Se ha estimado entre un 2% a un 6% los pacientes que solicitan una consulta para valorar cirugía refractiva.⁷



Figura 1. Comparativa entre córnea normal y córnea queratocónica.

Es una enfermedad con un rango muy variable de afectación clínica, desde sólo un leve astigmatismo irregular, hasta un adelgazamiento con protrusión avanzada y opacidades corneales. Debido a ello, el QC recibe diferentes definiciones o nomenclaturas según su afectación (**Tabla 1**):

1. QC incipiente; no se detectan signos clínicos en el examen biomicroscópico, pero sí se observan sombras en tijeras mediante retinoscopia. Se acompaña de un patrón topográfico compatible con QC.^{8,9}
2. QC posterior; es una rara anomalía congénita descrita por *Butler* en 1927,¹⁰ caracterizada por un aumento focal de la curvatura en la superficie posterior de la córnea que no tiene reflejo en la cara anterior, por lo tanto, el adelgazamiento resulta de un incremento en la curvatura de la cara posterior. A pesar de su denominación, no tiene relación con el QC anterior ni en su patogenia, ni por sus características clínicas, ni en su evolución, por lo que no se trata de un subtipo del mismo.
3. Pseudoqueratocono; este término se emplea para referirse a las situaciones en la que nos encontramos con alteraciones topográficas que simulan las encontradas en QCs clínicos y/o subclínicos pero ocasionadas por entidades diferentes: moldeamiento por lente de contacto (LC), traumatismo, error en la captura topográfica, etc.¹¹
4. QC frustre, subclínico o sospecha de QC; se trata de aquella entidad en la que la córnea presenta una topografía anormal (patrón de encurvamiento localizado), pero en la que no están presentes ninguno de los signos clínicos de la enfermedad ni existen otras causas que puedan explicar el patrón topográfico alterado (traumatismo, LCs, etc.). La agudeza visual (AV) es normal y el diagnóstico de la entidad es topográfico.¹² La misma terminología – sospecha, subclínico, frustre- se emplea para referirse a los casos de encurvamiento topográfico localizado más o menos manifiesto sin signos clínicos, pero sí existe un QC clínico en el ojo adelfo o antecedentes familiares de dicha enfermedad, situaciones que suponen el caso más claro de sospecha.¹³

Tabla 1. Signos clínicos y topográficos que aparecen en las diferentes nomenclaturas.¹⁴

	SIGNOS CLÍNICOS	TOPOGRAFÍA
QC incipiente	Alteraciones retinoscopía	Anormal
Otros grados	Alteraciones retinoscopía Signos biomicroscópicos	Compatible con QC
QC fustre/subclínico/sospecha	Ninguno	Anormal Similar a QC

1.1.1. Etiología

La naturaleza de su etiología no está clara, su incidencia varía notablemente dependiendo de la localización geográfica. Se estima 1 de cada 2000 habitantes en la población general, su probabilidad en consanguinidad es de 1 a 10, se encuentra en todas partes del mundo sin seguir ningún patrón geográfico, cultural o social conocido, por lo que no aseguran que sea una enfermedad hereditaria, aunque muchos estudios sostienen que el QC es un desorden genético que se transmite por herencia.⁶ Se cree que un aumento en la actividad de las enzimas proteolíticas en la córnea, debilita la cohesión en el conjunto de haces de fibras de colágeno, lo que reduce la integridad de la estructura.¹⁵ Si ésta es la causa, podríamos pensar que es una condición binocular, aunque también cabe decir que dicha expresión de genes tiene una penetración variable, es decir, afecta desde mínimamente hasta casos más avanzados, variando su intensidad no sólo entre pacientes, también entre ambos ojos.

Las razones de progresión o estancamiento tampoco se conocen bien, se especula sobre la edad de aparición en los pacientes (cuanto más temprana, es frecuente que progrese hasta estadios más avanzados de degradación del tejido corneal, pudiendo necesitar una QP), las condiciones de frotamiento ocular preferentemente en un solo ojo, etc.¹⁶

1.1.1.1. Predisposición genética

Desde el punto de vista genético, el QC se comporta de manera muy heterogénea, pero su expresión se ve determinada por un carácter bilateral, la incidencia familiar, la afectación de hermanos gemelos y los estudios de análisis genéticos.¹⁷ La concordancia es mayor en hermanos homocigóticos, pero a su vez, las diferencias topográficas entre éstos confirman el peso de la influencia ambiental añadida a la predisposición genética. El carácter familiar no es la forma de presentación más frecuente. El estudio realizado en colaboración, sobre la evaluación longitudinal del queratocono (CLEK, del inglés, Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus), lo ha cifrado en el 14%.¹⁸ Tras estudios

más específicos, se ha podido determinar que, con mayor frecuencia, la herencia es autosómica dominante con expresión variable. Por este motivo, se aconseja cautela al indicar cirugía queratorrefractiva en familiares de pacientes con QC,¹⁹ ya que se ha podido observar, que un elevado número de familiares asintomáticos muestra las características corneales de QC frustrada. La prueba más directa que confirma el papel determinante de la genética en la enfermedad es el estudio llevado a cabo en 95 familias (basado en tres índices topográficos).²⁰

1.1.1.2. Historia de alergia

Se han publicado numerosos estudios que asocian QC con alergia. Hay evidencias constantes de los cambios topográficos que ocurren en pacientes con queratoconjuntivitis vernal,²¹ aunque este hecho se asocia a un frecuente frotamiento cuyo papel también parece importante.²² Probablemente la teoría fisiopatológica de la degradación lenta pero sostenida de los tejidos corneales asociada a inflamación crónica de baja intensidad, que veremos más adelante, explique esta asociación poco clara.

1.1.1.3. Influencia hormonal y ciertas enfermedades sistémicas /oculares

Aunque se han encontrado algunas enfermedades endocrinas en pacientes con QC, su papel es difícil de confirmar. Incluso se ha sugerido que puede tratarse de hechos fortuitos, al igual que otras enfermedades sistémicas, como prolapso de válvula mitral, síndrome de Crouzon o Neurofibromatosis. En el caso del síndrome de Down y la amaurosis congénita de Leber, la asociación con el QC es alta. En ambas entidades, los pacientes manifiestan un frotamiento ocular intenso. En el primer caso, por la alta tasa de blefaritis y párpado laxo; en el segundo, por el estímulo visual (fosfenos) que sienten durante el frotamiento.²³

1.1.1.4. Picor y frotamiento ocular

Se ha evidenciado que el frotamiento ocular, a menudo muy vigoroso, es un elemento muy característico de las personas con QC. Incluso se ha sugerido que la forma de este frotamiento, puede determinar la forma de la ectasia.²⁴ Las razones que explican el frotamiento son variadas, la mayor parte de las veces es el picor intenso, no un simple prurito superficial. Se han descrito observaciones, que confirman la influencia del frotamiento ocular en el desarrollo y la progresión. Parece claro que la ectasia se desarrolla más en el lado de la mano dominante, que es la que frota el ojo con más intensidad.²⁴ En cualquier caso, parece que existe una triada (alergia–picor–frotamiento) que debe ser controlada.²²

1.1.1.5. Porte de lentes de contacto

Acerca del papel de las LC en la patogenia del QC se han propuesto muchas hipótesis, todas ellas pendientes de confirmar. En un primer momento, y bajo una visión puramente mecanicista de la fisiopatología, parecía que el uso de lentes de contacto rígidas (LCR) podría contribuir al control de su evolución, pero hace ya varias décadas, Gasset et al²⁵ responsabilizaron a las LCR de poder inducir QC. Los criterios diagnósticos en aquel momento eran muy diferentes a los actuales, y se pensó que se trataba de casos de QC incipiente, y que el astigmatismo había aconsejado la adaptación de lentes rígidas. No obstante, actualmente se acepta, que una adaptación incorrecta de las LC puede ocasionar un incremento de la ectasia. Aparte de la inflamación que se provoca en esos casos, un diseño muy curvo; con el fin de respetar el ápex corneal; puede facilitar un moldeamiento que empeore la ectasia, más aún en corneas con una respuesta biomecánica alterada (como en el caso del QC).²⁶

1.1.2. Semiología

Los síntomas y signos varían dependiendo de la gravedad de la enfermedad. En un estadio intermedio, se hace visible el adelgazamiento central o paracentral inferior, junto con los diferentes signos típicos de QC. En estados avanzados, el adelgazamiento y la ectasia se acentúan, explicando la acusada distorsión o pérdida visual. Los conos de tipo central se hacen más prominentes, los excéntricos tienden a caer más y en ocasiones se forma más de un ápice (**Tabla 2**).

Estos pacientes presentan diferentes síntomas como: disminución de la visión, distorsión de las imágenes, fotofobia, picor y por consiguiente frotamiento ocular; pero el síntoma conductor, es siempre la disminución de la AV. El reconocimiento espontáneo por parte del paciente, de la distorsión del contorno de las imágenes, es muy frecuente. La fotofobia aparece en fases avanzadas de la enfermedad. El picor y frotamiento, claro factor etiológico,²⁴ depende de las situaciones que lo desencadenan: a) pacientes con atopía: rinitis, fiebre del heno, eczema, asma, blefaritis, b) frotamiento como repuesta a situación de stress y tensión emocional, c) hábito de apretarse los ojos con el cansancio, d) intenso masaje o frotamiento ocular crónico en alteraciones psicológicas y estados convulsivos.

1.1.2.1. Adelgazamiento corneal

El espesor medio central de una cornea normal es de 535 micras,²⁷ los pacientes con QC muestran un adelgazamiento clínicamente significativo, la

parte más adelgazada será el ápex del cono, observable con lámpara de hendidura (LH) y cuantificable con paquimetría (**Figura 2**).

Tabla 2. Signos clínicos en los distintos estadios del QC.

ESTADÍOS ENFERMEDAD	SIGNOS
INICIAL	<ul style="list-style-type: none"> - Adelgazamiento corneal. - Nervios corneales muy visibles. - Sombras retinoscópicas "en tijeras". - "Signo de la gota de aceite" en oftalmoscopia.
INTERMEDIA	<ul style="list-style-type: none"> - Adelgazamiento estromal (central o paracentral). - Anillo de Fleischer. - Estrías de Vogt.
AVANZADA	<ul style="list-style-type: none"> - Cicatrices corneales. - Signo de Munson. - Signo de Rizzuti. - Patrón de tinción corneal en remolino.



Figura 2. Adelgazamiento corneal.

1.1.2.2. Nervios corneales

Los nervios corneales se hacen más visibles por un engrosamiento mayor que en las córneas normales. Se observan a través del biomicroscopio con sección óptica (**Figura 3**).

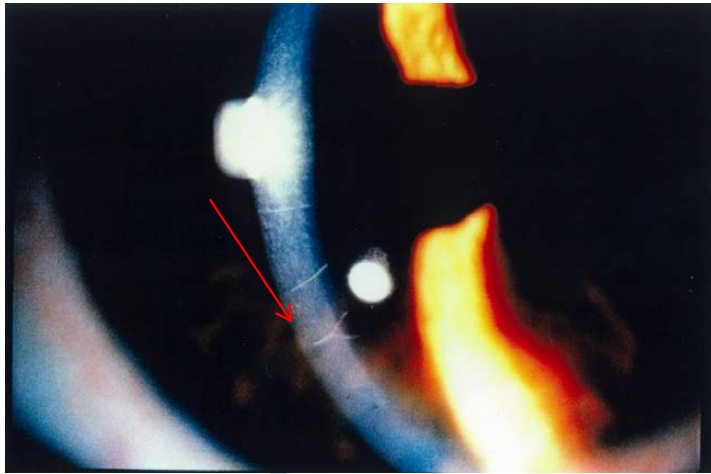


Figura 3. Nervios corneales.

1.1.2.3. Anillo de Fleischer

Se forma por el depósito de pigmento de hierro en la capa basal del epitelio que constituye la base del cono. Puede ser parcial o completo y tener un color ocre-marrón, dependiendo de la cantidad de pigmento depositado.²⁸ Observable a través de LH con luz difusa y filtro azul cobalto (**Figura 4**).

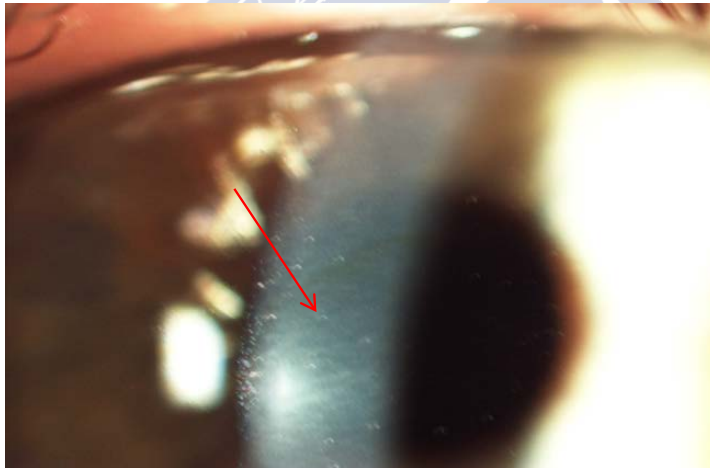


Figura 4. Anillo de Fleischer.

1.1.2.4. Estrías de Vogt

Son pequeñas líneas, normalmente verticales, aunque también oblicuas, situadas en el estroma profundo y en la membrana de Descemet, por lo general

paralelas al meridiano más curvo de la córnea.²⁹ Observables a través de LH con sección óptica (**Figura 5**).

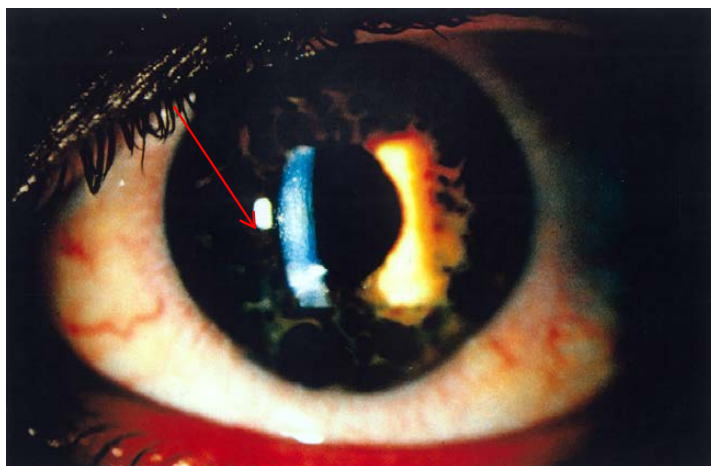


Figura 5. Estrias de Vogt.

1.1.2.5. Cicatrices corneales

Suelen observarse como pequeñas opacidades situadas en el ápex del cono y que podrían explicarse como un intento de reparación de la membrana de Bowman.²⁷ Observables con la biomicroscopía ocular.

1.1.3. Diagnóstico

Se trata de una enfermedad con un rango muy variable de afectación clínica, desde tan sólo un leve astigmatismo irregular, hasta un adelgazamiento con protrusión grave y opacidades corneales, acompañado por una intensa disminución de AV que requiere de QP.³⁰ Esta ectasia de la córnea induce un astigmatismo irregular, con o sin miopía, que conduce a un deterioro de la visión de leve a grave, tanto cualitativa como cuantitativamente. El diagnóstico del QC es clínico, y como tal, está basado en la presencia de los signos clínicos de la enfermedad; la topografía confirma el diagnóstico.^{1,30}

Las formas más avanzadas de esta enfermedad se diagnostican fácilmente mediante la clínica y la topografía. Sin embargo, en las formas incipientes existen dificultades debido a su curso clínico. Lo habitual es que el paciente con QC (en la adolescencia) consulte a un especialista debido a síntomas de visión borrosa y/o distorsión visual. El paciente con QC puede experimentar reducción visual antes de que la pérdida de AV pueda ser cuantificada. Otros síntomas que se pueden manifestar son fotofobia, deslumbramiento o irritación ocular. El

examen queratométrico, suele revelar un alto o bajo (según la afectación de la enfermedad) astigmatismo miópico irregular.

El estudio retinoscópico muestra la típica sombra en tijeras. El astigmatismo irregular corneal, se confirma al realizar la queratometría y las miras centrales no pueden ser superpuestas, es el signo inicial, la ausencia de paralelismo y una inclinación de las miras, que puede hacerse más evidente en mirada hacia arriba.

La biomicroscopía revela hallazgos característicos, comentados anteriormente, tales como nervios corneales visibles, anillo de Fleischer, estrías de Vogt y adelgazamiento estromal. Este adelgazamiento produce una excentricidad en la protrusión ectásica de la córnea que coincide con el ápex del cono, y que se encuentra con más frecuencia inferior-nasal a la horizontal del eje pupilar.¹⁷

La topografía corneal es uno de los métodos más sensibles para la detección de la enfermedad corneal ectásica temprana y para el seguimiento de su progresión. La topografía corneal computarizada a menudo suministra evidencia de enfermedad ectásica antes de que haya un adelgazamiento significativo de la córnea, o signos en el examen con LH. En algunos casos es difícil para el clínico distinguir entre un QC verdadero inicial y un corbatín asimétrico o un encurvamiento inferior debido a cambios inducidos por LCR. Los valores paquimétricos y aberrométricos pueden ser muy útiles para el diagnóstico. En ocasiones, únicamente los análisis repetidos en un periodo de muchos años, permitirán al clínico distinguir de una manera fiable entre lo patológico y lo normal, ya que uno de los signos más importantes de verdadero QC es la progresión en el tiempo.¹⁸

1.1.4. Clasificación

El QC es la degeneración ectásica corneal, más frecuente agrupada bajo el término anglosajón "corneal ectatic-disorders" (alteraciones ectásicas corneales),¹ siendo la degeneración marginal pelúcida (DMP) y el queratoglobo otros tipos de ectasia corneal. Se ha propuesto que las tres entidades podrían representar variaciones en la expresión fenotípica del mismo mecanismo patogénico, con diferente localización de la ectasia en función de la zona adelgazada. Ello explicaría la existencia de casos atípicos de QC con formas más globulares o más periféricas de lo habitual, controversias sobre el diagnóstico o casos con un tipo de degeneración en un ojo y otra diferente en el ojo adelfo.³¹ Sin embargo, los síntomas de picor y la imperiosa necesidad de frotamiento tan evidentes en el QC, no están tan presentes en el queratoglobo, ni en la DMP, que son por lo general, asintomáticos en su debut y progresión.¹

Las ectasias corneales pueden clasificarse, según su origen o según su localización:³²

1.1.4.1. Clasificación según su origen

- Natural*: QC, queratoglobos, DMP.
- Iatrogénica*: (ectasia tras cirugía refractiva corneal), o por traumatismo contuso.¹

1.1.4.2. Clasificación según su configuración

- Ectasia corneal axial (central o paracentral)*: QC, iatrogénica.
- Ectasia corneal generalizada*: queratoglobos.
- Ectasia corneal periférica*: DMP, degeneración marginal de Terrien, úlcera de Mooren, degeneración marginal en surco, queratitis ulcerativa periférica.

Globalmente, el QC es una ectasia corneal natural axial (central o paracentral).

1.1.4.3. Clasificación queratométrica-topográfica.

Se han diseñado algoritmos para ayudar a la identificación del QC. El índice de Rabinowitz-McDonell, se basa en el valor promedio del poder dióptrico central (PCD) y la diferencia en la curvatura entre puntos inferiores y superiores (I/S) (**Tabla 3**).^{33,34}

Tabla 3. Índices de Rabinowitz- McDonell.^{33,34}

	K central	Valor I-S
Normal	< 47.2	< 1.4
Sospecha de QC	47.2 – 48.7	1.4 - 1.9
QC	> 48.7	> 1.9

Otra clasificación queratométrica es la establecida por el grupo CLEK,¹⁸ que toma como referencia el meridiano corneal más curvo (K2) (**Tabla 4**).

También tenemos el Índice de Predicción de Queratocono KPI (del inglés, Keratoconus Prediction Index) elaborado por Maeda et al,³⁵ se obtiene a partir de otros ocho índices queratométricos. Este índice fue desarrollado para distinguir el QC clínico de otras topografías corneales. El criterio de umbral publicado para la identificación de patrones de QC que usa este clasificador es KPI >0.23%.

Tabla 4. Clasificación queratométrica de CLEK.¹⁸

	Meridiano más curvo [K2]	Radio de Curvatura
Leve	< 45 D	< 7.5 mm
Moderado	45 - 52 D	7.5 – 6.5 mm
Grave	> 52 D	< 6.5 mm

Por último, nos referiremos a la clasificación de Amsler- Krumeich. En 2006, se realizó una revisión de dicha clasificación, considerando valores de aberrometría corneal.³⁶ Los autores encontraron que el valor cuadrático medio (RMS) para el coma constituía un buen parámetro de clasificación (**Tabla 5**).

Tabla 5. Clasificación de Amsler-Krumeich modificada según aberrometría.¹⁴

CLASIFICACIÓN DE AMSLER-KRUMEICH MODIFICADA SEGÚN ABERROMETRÍA	
Estadio I	Lectura queratométrica central ≤ 48 D RMS entre 1,5 y 2 micras Ausencia de cicatrices
Estadio II	Lectura queratométrica central >48 D y ≤ 53 D RMS entre 2,5 y 3,5 micras Ausencia de cicatrices Espesor central mínimo >400 micras
Estadio III	Lectura queratométrica central >53 D y ≤ 55 D RMS entre 3,5 y 4,5 micras Ausencia de cicatrices Espesor central mínimo $>300 \leq 400$ micras
Estadio IV	Lectura queratométrica central >55 D RMS $>4,5$ micras Cicatrices corneales centrales Espesor central mínimo 200 micras

*RMS (Valor cuadrático medio del coma)

1.1.4.4. Clasificación morfológica

Los cambios topográficos también pueden ser valorados mediante los colores de los mapas, que nos dará una clasificación morfológica. La más completa, por referirse a todas las morfologías corneales, es la clasificación topográfica de Rabinowitz.³⁷⁻³⁹ (**Figura 6**).

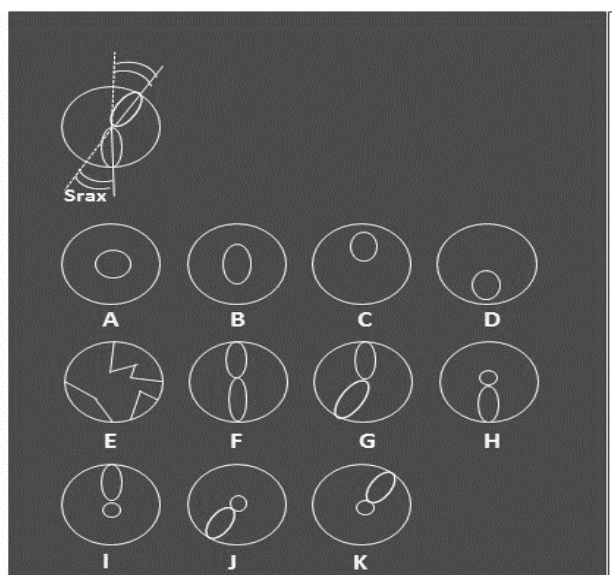


Figura 6. Clasificación topográfica de Rabinowitz: A) Central; B) Oval; C) Encurvamiento superior; D) Encurvamiento inferior; E) Patrón irregular; F) Pajarita simétrica; G) Pajarita simétrica con desviación de eje entre hemimeridianos (SRAX); H) Pajarita asimétrica inferior; I) Pajarita simétrica superior; J) Pajarita asimétrica SRAX inferior; K) Pajarita asimétrica SRAX superior.³⁶

1.1.5. Tratamiento

Los principales objetivos del tratamiento del QC consisten en mejorar la calidad visual, así como prevenir la progresión de la enfermedad.

1.1.5.1. Tratamiento óptico

Las opciones terapéuticas dependen de la severidad del astigmatismo irregular inducido, oscilando desde el uso de gafas y LC, hasta la QP y otras técnicas quirúrgicas. En los casos muy iniciales, las gafas y las lentes hidrofílicas pueden permitir una buena visión. Cuando la enfermedad avanza, resulta difícil conseguir una corrección útil con cristales, con lo que las LC rígidas gas permeable (RGP) son la elección de tratamiento en el 80% de los casos.⁴⁰ (Figura 7).

Galindo et al,⁴¹ entre otros, afirma que las RGP son un tipo de lentes que funcionan bien, pero que en algunos casos puede producir incomodidad y, en astigmatismos irregulares muy avanzados, imposibilidad de adaptación. Como

alternativa para paliar estos problemas surgió el sistema piggy-back y, actualmente, las lentes de contacto híbridas y esclerales (**Figura 8**).

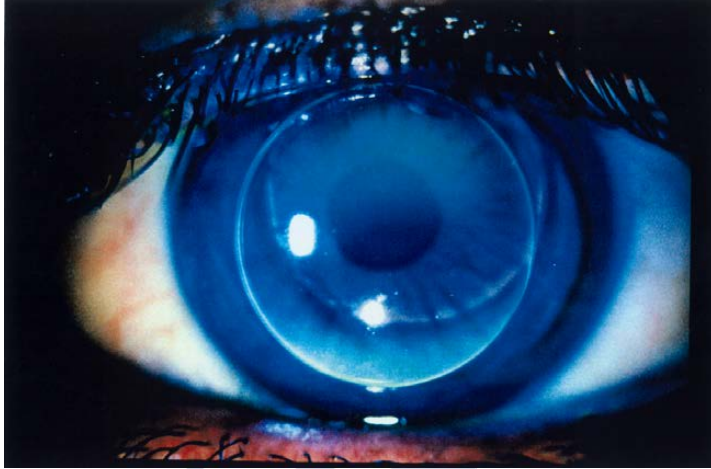


Figura 7. Lente de contacto RGP.



Figura 8. Lente de contacto híbrida.

1.1.5.2. Tratamiento quirúrgico

Los tratamientos quirúrgicos en el QC son sugeridos cuando el tratamiento óptico ha fracasado, o cuando la AV está significativamente reducida.^{42,43}

Los anillos intracorneales ofrecen una alternativa menos invasiva que la QP, para aquellos casos en los que no se logra mejoría de visión, ya que inducen un aplanamiento corneal que facilita los tratamientos con LC que se requieren para alcanzar una visión adecuada. La tecnología femtosegundo para la implantación de anillos intracorneales permite una cirugía mucho menos traumática en comparación con las técnicas mecánicas.⁴⁴ Los anillos intracorneales mejoran la AV en la mayoría de estos pacientes; pero aún existen dudas de la previsibilidad, así como de los efectos a largo plazo⁴⁵ (**Figura 9**). El cross-linking es una técnica que utiliza radiación UV en combinación con un fotosensibilizador (riboflavina: vitamina B2), para formar enlaces covalentes en el colágeno y así aumentar la rigidez corneal.⁴⁶ Esta técnica se utiliza para frenar la enfermedad, aunque a largo plazo puede ser necesario repetir el tratamiento. Como última opción está la QP. Una gran proporción de pacientes que se someten a trasplante corneal necesitan LC para alcanzar una mejor AV; ya que, en algunos casos, incluso después de la eliminación de suturas, puede existir alto astigmatismo. La utilización de unas u otras va a depender fundamentalmente del estado y de la progresión de la enfermedad.

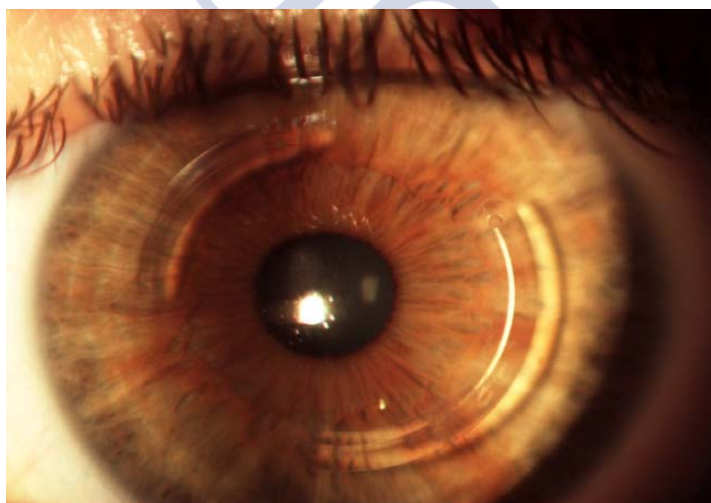


Figura 9. Imagen de los anillos intracorneales.

1.2. QUERATOCONO FUSTRE, SUBCLÍNICO O SOSPECHA DE QUERATOCONO.

El queratocono frustre, subclínico o sospecha de QC, designa la situación en la que la córnea presenta una topografía anormal, pero sin signos clínicos de la enfermedad, ni causas que puedan explicar el patrón topográfico alterado. Otro término empleado para referirse a las formas frustres es el de QC de baja expresividad.⁴⁷ No obstante, algunos autores establecen una diferenciación entre las distintas terminologías. El QC subclínico o forma frustre se utiliza para

referirse a un estadio muy precoz de la enfermedad con alteraciones topográficas similares a las del QC pero menos acentuadas.⁴⁸ Por otro lado, sospecha de QC se refiere a aquellas córneas que presentan características topográficas de sospecha, pero sin signos clínicos o historia de QC.^{49,50} Sin embargo, la mayoría de los autores no establecen tal diferenciación y algunos indican expresamente que se considera sospecha incluso si la aparición del patrón videoqueratoscópico (VQ) es muy similar al de una ectasia incipiente.⁵¹ En todo caso, la topografía está alterada en menor o mayor medida pero no existen signos clínicos y la AV es normal. Por lo tanto, el QC unilateral puede desarrollarse o permanecer en un estado inalterable al que se refieren como lo definido anteriormente: forme frustre, QC subclínico o sospecha de QC, que se estanca y no evoluciona, quedando un único ojo afectado clínicamente.¹

El seguimiento topográfico que muestra una progresión continua en el sentido de incremento del cono sugiere QC, pero no se considera diagnóstico sin la aparición de los signos clínicos.³⁰ La inestabilidad refractiva apunta a una posible evolución a forma clínica, pero al igual que sucede con la progresión topográfica, tampoco implica un diagnóstico por sí misma. La edad es un factor importante, ya que un paciente de mediana edad con refracción y topografía estable no es probable que progrese a QC clínico.¹³ Clásicamente,⁵² la progresión de forma subclínica a clínica se considera más probable en pacientes entre los 10 y 20 años, decrece ligeramente entre los 20 y 30 años, y es improbable que ocurra después de los 30 años. Por otro lado, la estimación del carácter bilateral o unilateral de la enfermedad es difícil de establecer, ya que cuando examinamos casos iniciales el porcentaje de unilaterales es muy superior al que se encuentra cuando se trata de casos más evolucionados. Además, va a depender de los métodos usados para su diagnóstico. El porcentaje de QC subclínico oscila entre el 14,3% al 41% en varios estudios antiguos que disponían de pocas técnicas diagnósticas.⁵³ Con las técnicas topográficas y paquimétricas más actuales, la frecuencia estimada oscila entre el 0,5% al 4%.⁵⁴ Otro estudio más reciente estima la incidencia en el 4,5%.⁵ La prevalencia de la sospecha de QC en candidatos a cirugía refractiva es de un 5.5% a un 10%,⁵⁵ mientras que se estima en un 0.5% en la población general.^{30,56} Este elevado porcentaje entre los candidatos a cirugía refractiva no se debe sólo a una autoselección sino también a la sensibilidad de la topografía como herramienta de cribado de QC.

Los ojos con QC frustre, subclínico o sospecha de QC, presentan una mayor dificultad en su diferenciación con respecto a los astigmatismos regulares, ya que su visión compensada con lentes oftálmicas no es significativamente distinta a la de sujetos sin patología. Son muy difíciles de detectar aun disponiendo de los medios adecuados, más aún cuando existe una falta de definición de los criterios de umbral, por lo que se han documentado resultados postoperatorios imprevisibles y el descontento de pacientes por la inexistencia de

un diagnóstico de sospecha de QC antes de la cirugía refractiva. Los topógrafos corneales nos ayudan a descubrir cambios topográficos en la superficie corneal, permitiéndonos analizarlos temporalmente cualitativa y cuantitativamente. Estos estudios temporales topográficos corneales deberían ser esenciales antes de la cirugía refractiva. Por otra parte, el concepto de frente de onda se ha introducido recientemente en la praxis refractiva, ya que permite conseguir unos resultados más personalizados en las operaciones y así minimizar las aberraciones del frente de onda del ojo.⁴⁹

1.2.1. Diagnóstico

El diagnóstico de la forma frustre de QC constituye un desafío, ya que no existe ninguna prueba o test para su diagnóstico de forma exacta e inequívoca. Actualmente se basa en un diagnóstico topográfico, pero paradójicamente no existe una combinación mínima de criterios topográficos umbral para definir la forma subclínica.¹ Existen pacientes con córneas curvas y astigmatismos elevados que no presentan QC y, a la inversa, pacientes con QC que tienen valores de curvatura normales en el centro de la córnea.⁷ Los primeros criterios diagnósticos se establecieron sobre índices derivados de la topografía, es decir, se basan en el patrón de curvatura de la cara anterior de la córnea, elevación de la cara posterior, valores paquimétricos y aberrométricos.⁷ En el análisis de la paquimetría como sistema de detección, tiene más valor la comparación entre espesores de diferentes sectores de la córnea y esta idea es la que está siendo evaluada mediante diferentes sistemas de tomografía corneal, con el fin de generar índices que permitan el diagnóstico precoz.⁵⁷ En cuanto al estudio de la cara anterior, ofrece una información incompleta y a veces confusa. Si tenemos en cuenta que el adelgazamiento corneal es la característica clave del QC, la información tanto de la cara anterior como de la posterior es crítica para evaluar cualquier alteración ectásica corneal.⁵⁸ También se ha demostrado que la aberrometría corneal podría ser un método más precoz que la topografía en la detección de la sospecha de QC.⁴⁹

Actualmente existen diversos criterios topográficos y paquimétricos propuestos para el diagnóstico de QC subclínico. Cada uno podría considerarse como un dato de alarma, siendo la probabilidad de estar ante un QC subclínico proporcional al número de alarmas presentes. Además, estos criterios deben incluir la edad del paciente, historia familiar de QC, historia de patología local o sistémica asociada al QC, estabilidad refractiva y buena AV con corrección.

1.2.2. Reconocimiento de patrones típicos topográficos

Los patrones considerados de sospecha son aquellos con áreas aisladas de encurvamiento, asimetría inferior-superior, desviación de eje entre

hemimeridianos o patrones en J (forma menos acentuada de patrón en AB/SRAX) y J invertida (forma similar con encurvamiento superior; un patrón en espejo de la forma en J), córneas más curvas de lo normal, patrones en D y en patas de cangrejo^{30,59} (**Figura 10**).

1.2.2.1. Patrón en pajarita asimétrico, patrón en J y en J invertido

Los patrones en pajarita asimétricos con desviación del eje entre hemimeridianos del eje más curvo (AB/SRAX) o los patrones en J (equivalente menos acentuada de dicho patrón), tienen una prevalencia especialmente elevada en el ojo adelfo de los ojos con QC clínico y es un marcador de riesgo de progresión a QC. El patrón J invertido, es el que se encuentra con una prevalencia significativamente mayor en familiares de pacientes con QC, y se considera que puede reflejar la expresión de una predisposición genética a la enfermedad, o forma frustre o de baja expresividad de QC.⁴⁷

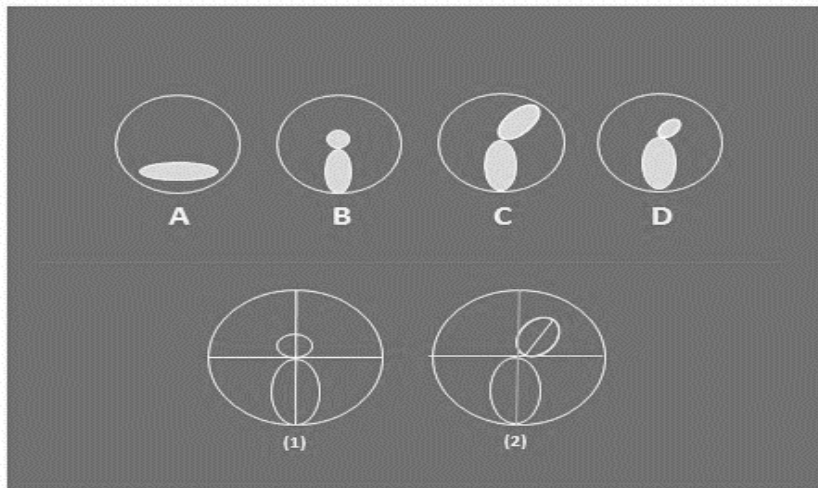


Figura 10: Patrones topográficos de sospecha de QC subclínico: A) Área aislada de encurvamiento; B) Pajarita asimétrica inferior-superior sin desviación de eje entre hemimeridianos (SRAX); C) Pajarita simétrica con SRAX; y D) Pajarita asimetría con SRAX o Patrón en J y J invertida.³⁰

1.2.2.2. Patrón en D vertical

Se ha descrito otro patrón de sospecha de QC como Patrón en D vertical.³⁸ Se ha identificado de forma retrospectiva en caso de ectasia post-LASIK (LASIK, del inglés; laser assisted *in situ* keratomileusis), y de forma prospectiva en otros ojos que presentaban algunas otras anomalías sugestivas de QC. Aparte del patrón en D vertical, estos ojos presentaban paquimetrías inferiores a 500 μm y elevación de la cara posterior de la córnea, medida mediante Pentacam, mayor

de 20 μm . El patrón en D vertical, tiene una asimetría en la curvatura horizontal (ratio temporal-nasal) mayor que en la vertical (ratio inferior-superior).

1.2.2.3. Patrón en pata de cangrejo

En un estudio sobre las características topográficas del QC y sospechas de QC en ojos asiáticos, se detectó un patrón en patas de cangrejo o similar al de DMP,⁶⁰ previamente descrito por Rabinowitz⁵⁶ como el patrón tipo DMP. Conviene considerar aquí que el aplanamiento debajo del eje visual, se ve en algunos mapas axiales de casos con QC de localización más periférica. Los pacientes con sospecha de QC con este tipo de patrón con frecuencia tienen astigmatismo en contra de la regla.

1.2.3. Índices cuantitativos

Se han desarrollado varios índices tales como de Rabinowitz-McDonnell³³ para el diagnóstico de sospecha QC (ver **Tabla 3**), y la clasificación propuesta por el grupo CLEK, que introduce el llamado índice KSS⁶¹ (**Tabla 6**). Estos índices han demostrado tener una elevada sensibilidad y especificidad, aunque pueden generar falso negativos en la identificación de patrones tipo pelúcida.

Tabla 6. Índice KSS para la detección del QC.¹⁴

Índice KSS	K medio central	Patrón Topográfico	HORMS	LH
0 (no afecto)	≈ 47.75	Patrón axial típico	$\leq 0.65 \mu\text{m}$	Sin signos
1 (caso atípico)	≤ 48	Patrón axial atípico	$\leq 1.00 \mu\text{m}$	Sin signos
2 (sospecha de QC)	≤ 49	Patrón axial con área aislada de encurvamiento	$1-1.5 \mu\text{m}$	Sin signos
3 (leve)	≤ 52	Queratocono	$1.5-3.5 \mu\text{m}$	Signos
4 (moderado)	$52-56$	Queratocono	$3.5-5.75 \mu\text{m}$	Signos
5 (avanzado)	> 56	Queratocono	$> 5.75 \mu\text{m}$	Signos

*HORM; valor medio de las aberraciones de alto orden.

Para poder comparar estos índices con los hallazgos bien establecidos que definan inequívocamente la enfermedad, se debe tener en cuenta que los pacientes con sospecha de QC se excluyeron de algunos estudios, ya que no existen otros estándares aceptados para el diagnóstico más que la topografía. El tipo de pacientes incluidos en los estudios es un dato importante para valorar la posible utilidad de los índices propuestos en la identificación de los pacientes con sospecha de QC. No obstante, la mayoría de estos índices fueron desarrollados para diferenciar QC de ojos normales y no tanto de sospechas de QC. El clásico

índice de Rabinowitz-McDonnell modificado se desarrolló a partir de ojos con QC clínico.³⁰ En los demás estudios, los autores aclaran que las córneas con áreas localizadas de aumento de curvatura en el VQ sin los signos clínicos convencionales se excluyeron del estudio, por lo que no es un sistema dirigido a detectar estos casos y los clasifica como ojos normales. Sin embargo, el índice KSS, permite graduar la gravedad del QC, tomando valores basados en los hallazgos biomicroscópicos, la topografía corneal, el poder corneal promedio, y el valor cuadrático medio de las aberraciones corneales de alto orden (calculadas para una zona de 6 mm de diámetro).

Resaltar de nuevo, que el seguimiento topográfico que muestra una progresión continua en el sentido de incremento del cono sugiere QC, pero no se considera diagnóstico sin la aparición de los demás signos clínicos.³⁰ En definitiva, aunque el QC es una enfermedad que cursa con adelgazamiento e incremento de la curvatura corneal, ninguno de estos parámetros de forma aislada son útiles para el diagnóstico ni del QC, ni de las formas subclínicas. Sería un diagnóstico topográfico, que paradójicamente no existe una combinación mínima de criterios topográficos umbral para definir las formas subclínica.

1.3. BIOMECÁNICA Y QUERATOCONO

La biomecánica corneal nos permite estudiar el movimiento o deformación de este tejido cuando se somete a una fuerza. La investigación en biomecánica corneal aplicada al QC refiere, que la rigidez corneal se encuentre disminuida⁶² o que la resistencia mecánica disminuida permite la protrusión del tejido.^{30,63} Posteriormente, se establece que el entrecruzamiento de las fibras de colágeno se encuentra alterado y disminuido, lo que junto a rupturas en la membrana de Bowman, favorecen la "debilidad" estructural.³⁰ Estos conocimientos del comportamiento corneal en condiciones fisiológicas y patológicas, primarias o secundarias, es debido en gran parte al desarrollo tecnológico que nos han facilitado la adquisición de nuevas, valiosas y costosas herramientas diagnósticas.

1.3.1. Microscopio confocal

1.3.1.1. *Ex vivo*

Los estudios de córneas obtenidas por QP en pacientes con QC, desde un punto de vista estructural, han revelado numerosos cambios mediante el uso de microscopia óptica, microscopía electrónica, y técnicas de inmuno-histoquímica utilizando anticuerpos monoclonales específicos.^{64,65} Sin embargo, los resultados de estas investigaciones han contribuido muy poco al conocimiento de la etiología de esta enfermedad.

Los hallazgos histológicos incluyen, además del adelgazamiento estromal, afinamiento e irregularidad del epitelio, particularmente en la capa de células basales que puede asociarse a disminución del espesor de la membrana basal. En el epitelio se observan depósitos intra e inter-celulares de ferritina (anillo de Fleischer).⁶⁶ Un hallazgo característico es la ruptura de la capa de Bowman, con movilización focal de queratocitos y depósitos de colágeno (cicatrización).⁶⁷ Este proceso cicatricial puede afectar el estroma más superficial en estados avanzados. Los resultados sugieren una disminución del número de lamelas estromales sin alteraciones del volumen de colágeno, y con disminución relativa de proteoglicanos.⁶⁸ La córnea de pacientes con QC tiene una menor interconexión laminar superficial con disminución de zonas de unión con la capa de Bowman, particularmente a nivel del cono.⁶⁹ Otro hallazgo ultraestructural es la presencia de depósitos fibrilares y granulares dentro del estroma. El recuento de queratocitos se encuentra disminuido en córneas con QC, posiblemente mediado por apoptosis.^{70,71}

Desde el punto de vista bioquímico, se han observado distintos grados de activación de citoquinas y factores de crecimiento en epitelio y estroma,⁷² como también anormalidades en el equilibrio entre las metaloproteasa de matriz (MMP, del inglés matrix metalloproteinases) e los inhibidores de dichas MMPs estromales.⁷³

1.3.1.2. *In vivo*

Las observaciones realizadas *in vivo* nos permiten la valoración de pacientes con QC más inicial, donde el epitelio presenta modificaciones de menor o mayor grado relacionadas con el estado clínico de la enfermedad.⁷⁴⁻⁷⁶ En dichos estados iniciales puede observarse mayor irregularidad en la relación entre células hiper e hiporreflectivas planas superficiales. Con el avance de la ectasia, las células superficiales adoptan una configuración más elongada, con aplanamiento de la capa intermedia e irregularidad de la capa basal, con tractos hiperreflectivos en continuidad y con rupturas de la capa de Bowman. Estos espacios son ocupados por extensiones de queratocitos y depósitos extracelulares. Particularmente en el epitelio, pero también en el estroma superficial, se pueden ver depósitos reflectivos que corresponderían a ferritina (anillo de Fleischer). Dentro del estroma, la densidad de queratocitos varía dependiendo de si los pacientes han utilizado o no LC. En pacientes con QC usuarios de LC los queratocitos más superficiales aumentan de densidad inmediatamente por debajo de la capa Bowman en relación con no usuarios.⁷⁶

1.4. SISTEMA INMUNOLÓGICO E INFLAMACIÓN EN LA SUPERFICIE OCULAR

Antes de exponer la posible asociación entre el sistema inmunológico y la inflamación con el QC, se define este capítulo de conceptos generales del sistema inmunológico e inflamación en la superficie ocular.

La inflamación constituye un mecanismo de defensa, reparación y preludio, a la recuperación funcional puesta en marcha por el organismo cuando existe una alteración importante en la homeostasis de un tejido. Habitualmente se trata de una respuesta inespecífica frente a las agresiones del medio, y tiene lugar principalmente en tejidos conectivos vascularizados. La respuesta inflamatoria (RI), tiene como finalidad inmediata detener la agresión y, posteriormente, reparar sus consecuencias. Se trata de un fenómeno básicamente local,⁷⁷ pudiendo ser secundario a una respuesta inmune.

Las causas que pueden dar lugar a una RI son numerosas y variadas. Entre los principales desencadenantes de la inflamación podemos citar la agresión física (traumatismos oculares contusos y penetrantes, intervenciones quirúrgicas intra y extraoculares, roce sistemático provocado por una LC, radiaciones, cambios bruscos de temperatura), la actividad química (causticaciones, reacciones químicas), la actividad de microorganismos (virus, bacterias, hongos) y la agresión inmunológica (detección y respuesta frente a los diferentes tipos de Ags). El organismo provoca en los tejidos vascularizados, una cascada inespecífica de procesos fisiológicos en los que participan elementos del sistema inmunitario innato, con el fin de reparar el daño celular y de restablecer la función normal del tejido.⁷⁸

El sistema inmune de mamíferos utiliza una serie de mecanismos para detectar y eliminar patógenos invasores, muchos de los cuales requieren la discriminación entre lo "propio" y lo "no-propio". La respuesta inmune se clasifica en *inmunidad innata* e *inmunidad adaptativa*. Ambos procesos reconocen microorganismos invasores como "no-propios", lo que desencadena la respuesta inmune primaria e inflamatoria secundaria para eliminarlos. En general, la inmunidad innata, altamente conservada en organismos multicelulares, representa la primera línea de defensa contra los patógenos y no requiere la exposición previa del organismo a antígenos ajenos para su activación. Los tipos celulares que participan en la inmunidad innata son los macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y células NK (NK, del inglés Natural killer). La detección de patógenos se basa en el reconocimiento de proteínas altamente conservadas que se expresan en los organismos infecciosos. Por otra parte, la inmunidad adaptativa se activa a través de señales procedentes del sistema inmune innato que inducen la proliferación de linfocitos T y B específicos de Ag. La respuesta adaptativa es mucho más compleja que la respuesta innata, debiendo reconocer a un número elevado de Ags que la activen. Para ello, cuenta con un complejo

sistema de reordenaciones génicas que permiten la expresión de receptores específicos para cualquier Ag. Así, cada clon de linfocitos T y B expresa un receptor antigénico distinto. A pesar de esta gran diversidad, el sistema inmune adaptativo ha sido muy estudiado, mientras que la investigación en la respuesta inmune innata está menos avanzada.⁷⁷ Aun así, se considera la posibilidad de una asociación entre la inflamación de la superficie ocular y una desordenada respuesta de la inmune innata, es decir, que cualquier tipo de anomalía en la inmunidad innata puede conducir a la inflamación de la superficie ocular.⁷⁹

1.4.1. Inflamación aguda

La inflamación aguda es un proceso a corto plazo y se caracteriza por cinco signos cardinales; rubor (enrojecimiento), debido al aumento del flujo sanguíneo secundario a la dilatación de pequeños vasos sanguíneos. Calor, producido por el metabolismo de los leucocitos y macrófagos que acuden al lugar de la lesión, y por el aumento del flujo sanguíneo. Tumor (hinchazón), debido al edema que se produce al acumularse el líquido que sale de los vasos. Dolor, producido por los nervios irritados. Diversos mediadores químicos, como las prostaglandinas, la histamina, la bradisinina y serotonina, pueden afectar directamente a los nociceptores o sensibilizarlo al tacto o al movimiento. Por último, la pérdida de función, que se debe al funcionamiento de los tejidos en condiciones que no son homeostáticas y de gasto de energía en procesos de reparación.⁷⁷

1.4.2. Inflamación crónica

La inflamación crónica es la incapacidad de resolver la inflamación aguda y suele causar un daño corporal importante. Se produce cuando ni el agente ni el huésped son lo suficientemente potentes para superar al otro. Puede durar semanas, meses o años y causa lesiones crónicas formadas por tejido conectivo laxo, fibroblastos infiltrados y células inflamatorias. Los monocitos-macrófagos son, con diferencia, el tipo predominante de la célula inflamatoria. Es el único tipo de célula presente en una inflamación crónica debida a un agente no antigénico. Si los agentes lesivos también son antigénicos, aparecen otro tipo de células, como los linfocitos, las células plasmáticas y los eosinófilos.⁷⁹

Se caracteriza por la lesión tisular progresiva por especies reactivas del oxígeno y proteasas que son secretadas por las células inflamatorias. Otros productos, como el ácido araquidónico y las citocinas pro-inflamatorias, amplían y propagan esta lesión tisular. Se trata de un círculo vicioso que produce síntomas clínicos típicos de las enfermedades inflamatorias crónicas. Pueden afectar a cualquier parte del cuerpo, y algunas no siguen la terminología convencional, por lo que, se ha contemplado con considerable interés el papel de la inflamación en enfermedades que tradicionalmente no fueron clasificadas

como inflamatorias. De hecho, hoy en día se reconoce que la inflamación es un componente patológico fundamental en muchos procesos degenerativos, desde la enfermedad de Alzheimer hasta el QC.⁸⁰

Aunque la asociación entre la inflamación y el daño tisular se conocía desde hace tiempo, la primera se consideraba principalmente el resultado del daño más que una causa de ésta. Hasta la fecha, se ha demostrado que el ciclo destructivo y auto-estimulado entre el estrés oxidativo y la inflamación resultante produce más estrés oxidativo, y contribuye a la aparición de enfermedades crónicas. Esta cadena de acontecimientos puede producirse inicialmente en un nivel bajo y asintomático, lo que hace suponer que la inflamación crónica subaguda podría ser la causa de diversas patologías.⁷⁷ La inflamación puede considerarse como la expresión de un conjunto de procesos celulares y moleculares complejos, que conducen a la defensa de los tejidos lesionados por un agente causal cualquiera que fuere su naturaleza.

1.4.3. Mediadores inflamatorios que mantienen la RI

Son moléculas solubles que actúan localmente en el lugar de la lesión y regulan la RI. *Mediadores exógenos* (producidos fuera del organismo) como las endotoxinas (presentes en la membrana celular de las bacterias Gram-negativas) y las exotoxinas (segregadas por éstas) que se unen a los receptores situados en los monocitos y los macrófagos, activándolos. *Mediadores endógenos* (producidos dentro del organismo) de las células lesionadas o activadas en la zona de inflamación. Son muchas las moléculas que regulan la inflamación, y un gran número de ellas tienen funciones aparentemente redundantes en el sistema inmunitario innato, lo que demuestra la estrecha relación entre ambos tipos de respuestas.⁷⁷

1.4.4. Mediadores que contribuyen a la respuesta inmunitaria e inflamatoria

1.4.4.1. Citocinas

Las células inmunitarias innatas sintetizan y segregan una amplia variedad de sustancias químicas solubles denominadas mediadores inflamatorios. Una clase importante de estos mediadores son las citocinas, productos celulares que son sintetizados en respuesta a un daño o estímulos inmunológicos, induciendo una RI. Suelen actuar a corta distancia y durante un periodo breve.⁸¹⁻⁸⁴ Por lo tanto, las citocinas son mediadores solubles de las respuestas inflamatoria e inmunitaria, tanto innata como adaptativa. Estos péptidos o glucoproteínas son activos a concentraciones de entre 10^{-9} y 10^{-15} M. En general, los macrófagos son sus principales productores durante la inmunidad innata y las células T durante la inmunidad adaptativa. La mayoría actúan localmente (acción paracrina) o sobre

las células responsables de su producción (acción autocrina). Sin embargo, otras son capaces de actuar sobre células más distantes al lugar de su síntesis (endocrino). La red de citocinas muestra tanta redundancia como pleotropía, superponiendo efectos moleculares, así como su capacidad de actuar de forma efectiva sobre numerosas estirpes celulares.

Los receptores de citocinas no se restringen a las células del sistema inmunitario, y se encuentran ampliamente distribuidos en tipos celulares distintos.⁸⁵ Entre ellas se encuentran las linfocinas (citocinas sintetizadas por los linfocitos), las monocinas (sintetizadas por los monocitos), las quimiocinas (factores quimiotácticos sintetizados por diversas células) y las interleucinas (ILs; son fabricadas por los leucocitos y tienen efectos pleiotrópicos). Por otro lado, las citocinas han sido agrupadas en subfamilias, según su estructura y su función principal:

1. *Factores estimulantes de colonias*: como su nombre sugiere, intervienen en el desarrollo y diferenciación de las células inmunitarias a partir de precursores de la médula ósea.
2. *Interferones (IFN)*: mientras que el IFN- α y el IFN- β participan en la protección contra la replicación viral, el IFN- γ desempeña un papel significativo en la regulación de la respuesta inmunitaria. El IFN- γ es producido por los linfocitos T y los linfocitos NK. Actúa sobre los leucocitos, las células tisulares y los linfocitos T colaboradores. En un proceso inflamatorio, el IFN- γ también activa los fagocitos y aumenta la adhesión de los leucocitos al endotelio.⁸⁴
3. *Interleucinas (ILs)*: actualmente existen más de 30 ILs reconocidas, que participan en la regulación de las respuestas inmunitarias tanto innata como adaptativa. Tal como se ha comentado anteriormente, son producidas por numerosos tipos de células inmunitarias (y otros tipos de celulares). Como su nombre sugiere, su modo de acción principal es la comunicación entre los leucocitos. Las más implicadas en procesos inflamatorios oculares son:
 - i. *IL-1*: Son producidos por fagocitos, linfocitos, células endoteliales y otras células. Actúan sobre los linfocitos, los macrófagos y las células endoteliales, aumentando así la expresión de moléculas de adhesión.^{86,87}
 - ii. *IL-6*: Los linfocitos, los macrófagos, los fibroblastos y las células endoteliales producen IL-6. Sus acciones también son similares a las de la IL-1, pero ésta es incapaz de activar a

fibroblastos y células endoteliales. Además de promover la diferenciación de los linfocitos B, estimula la producción de proteínas de fase aguda de la inflamación. En la córnea, se ha observado que estimula la migración celular epitelial. También puede estimular la síntesis de diferentes MMP.^{88,89}

- iii. *IL-8*: Producida por macrófagos, células endoteliales y fibroblastos. Actúa sobre los neutrófilos, los basófilos y los linfocitos T. Sus principales acciones son quimiotácticas y angiogénicas.
- 4. *Familia del factor de necrosis tumoral (TNF)*: El TNF- α deriva de los macrófagos, los mastocitos, los linfocitos y las células endoteliales y queratocitos. Sus dianas y efectos son similares a los de la IL-1 aunque presenta algunas diferencias. El efecto activador de los linfocitos T y B es menor y no es capaz de inducir la síntesis de inmunoglobulinas (Igs) en los linfocitos B activados.⁹⁰ Además, estimula la angiogénesis y tiene otras funciones aparte de la inflamación. Esta combinación de TNF, IL-1 y factores estimuladores de colonias constituye un mecanismo de retroalimentación poderoso que comienza con la inflamación tisular y conduce a la formación de un gran número de leucocitos defensivos que ayudan a eliminar la causa de la inflamación.
- 5. *Quimiocinas*: son una familia de citocinas que producen quimioquinesis, es decir, movimiento de respuesta a un estímulo químico. El interés en los receptores de estos mediadores ha aumentado considerablemente, ya que algunos parecen actuar como correceptores para la infección, en particular para la infección de los linfocitos por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

Los principales reguladores químicos de la respuesta inmune son las citocinas y quimiocinas, siendo las más implicadas en la RI ocular la IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- α . Sin embargo, en la inflamación intervienen otras moléculas de carácter inhibitorio que controlan el desarrollo excesivo del proceso inflamatorio. Entre ellas, se incluyen las citocinas con actividad anti-inflamatoria. Las citocinas con mayor capacidad anti-inflamatoria son la IL-4 e IL-10. La IL-4 inhibe la síntesis de IL-1, IL-6, IL-8 y TNF α ; y la IL-10 inhibe la síntesis de IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 y TNF- α .⁹¹

1.4.4.2. Proteasas de la matriz extracelular

Las MMPs son enzimas que juegan un papel reseñable en diferentes procesos fisiológicos, inflamatorios y patológicos.⁹² Esta familia de proteínas está

implicada principalmente en procesos de lisis de la matriz extracelular. Reciben el nombre de metaloproteasas de la matriz por ser enzimas cuyo mecanismo catalítico involucra la participación de diferentes metales (zinc, cobalto, etc.). Las MMPs son liberadas principalmente por los leucocitos polimorfonucleares (PMN) y con frecuencia son secretadas en su forma inactiva para ser activadas tras el contacto con diferentes proteínas que son liberadas en procesos de lisis o apoptosis celular. Entre sus funciones se encuentra la degradación de fibras de colágeno tipo I, II, III, IV y V, gelatinas, elastina, fibronectina (cFn) y otros. Aunque existen otras, la gelatinasa A (MMP-2) y la gelatinasa B (MMP-9) son las principales enzimas producidas por el epitelio corneal y los queratocitos estromales, con el objeto de degradar la matriz extracelular en el proceso de restauración tisular.⁹²

La gelatinasa A (MMP-2) digiere fácilmente las gelatinas y también escinden los colágenos tipo IV, V, la elastina, la cFn y la laminina. La gelatinasa B (MMP-9) parece estar directamente implicada en el procesado de los componentes de la membrana basal del epitelio corneal. Digerie fácilmente el colágeno tipo I, III, IV, V y la elastina. Se ha demostrado su participación en el remodelado de la matriz extracelular tras la agresión de la superficie ocular, en diferentes procesos como son la úlcera corneal estéril, el ojo seco y otros procesos patológicos.⁹³

Cabe destacar que en la superficie ocular la cFn juega un papel importante en la cicatrización de la córnea. La fibronectina, que puede originarse de los vasos sanguíneos conjuntivales a través de la película lagrimal, o de la propia córnea, células epiteliales y queratocitos, aparece en el lugar del daño tisular y desaparece después de la cicatrización.⁹⁴

1.4.4.3. Receptores Toll-Like

La córnea posee privilegio inmune, al que contribuye la ausencia de vascularización y drenaje linfático, así como de células presentadoras de Ags. Además, la córnea produce factores inmunosupresores; a pesar de ello, en el tejido corneal se desarrollan reacciones inmunológicas e inflamatorias. El tejido corneal tiene capacidad para sintetizar y secretar numerosas citocinas, IFN, Igs y moléculas de adhesión, tal como ya se ha mencionado.⁹⁵ Debido a que la córnea está expuesta constantemente a agresiones externas (infecciosas, tóxicas y traumáticas) necesita mecanismos de defensas mecánicos, anatómicos e inmunológicos para mantener la transparencia ocular. Los mecanismos corneales inmuno- e inflamatorios dependientes incluyen la producción de inmunoglobulinas (Igs) en lágrima, secreción de citocinas por las células epiteliales corneales y queratocitos, nervios corneales, complemento, IFN y células como los neutrófilos, eosinófilos y macrófagos. Asimismo, están

involucradas las células Th1 y Th2 que implican la presentación de Ags y la respuesta mediada por linfocitos T y/o B.⁹⁵ Por lo tanto, a nivel corneal se pueden producir procesos asociados tanto a la inmunidad innata como adaptativa.

Para mantener la homeostasis ocular es necesaria una repuesta inmune innata capaz de responder de manera inmediata y eficaz ante cualquier tipo de agresión exógena (infecciosa) o endógena (daño celular). Deben detectar la presencia y naturaleza de estos agentes, representando la primera línea de defensa del huésped y controlando la iniciación y desarrollo posterior de la respuesta inmune adaptativa y de la RI. La respuesta inmune innata no goza de la diversidad de la respuesta adaptativa y debe reconocer los antígenos a través de un grupo de receptores predeterminados. Para ello, estos receptores se han especializado, a lo largo de la evolución, en el reconocimiento de determinadas estructuras altamente conservadas en grandes grupos de microorganismos. Estas estructuras reciben el nombre de *patrones moleculares asociados a patógenos* (PAMPs, del inglés pathogen associated molecular pattern). Por otro lado, los receptores del sistema inmune innato que reconocen estos PAMPs se denominan *receptores de reconocimiento de patrones* (PRRs, del inglés pattern recognition receptors). Hay un determinado número de receptores clave que reconocen una amplia variedad de PAMPs, entre los que se incluyen los receptores Toll Like (TLR), los receptores NOD-Like (NLR) y los receptores RIG-I-like (RLR; del inglés RIG-I-Like receptors). Todos estos receptores actúan solos o con la participación de otras moléculas, generando la respuesta inmune innata.⁹⁶

Los TLR son proteínas transmembrana tipo I, evolutivamente muy conservados. Toll fue originariamente identificado como una molécula esencial que determina el eje dorsoventral en la embriogénesis de la *Drosophila*,⁹⁷ organismo que sólo posee inmunidad innata. Además de su función en el desarrollo, Toll también demostró que estaba implicado en la defensa del huésped, ya que las moscas *Drosophila* que no tenía Toll sucumbían a infecciones fúngicas. Nusslein-Volhard acuñó el término alemán de "toll" ya que las moscas que carecían de este receptor se desarrollaban de una forma "extraña o fantástica" (del alemán "toll").⁹⁸ En 1997, fue identificado el primer homólogo humano del receptor toll de *Drosophila*, y fue llamado receptor toll-like (TLR), hoy conocido como TLR4.⁹⁹ Los TLRs están constituidos por un dominio extracelular rico en el aminoácido leucina, común a multitud de proteínas implicadas en el reconocimiento de ligandos y la transmisión celular de señales, cuya activación parecía inducir la expresión de genes que participan en la RI. Años más tarde se llevó a cabo la secuenciación del receptor Toll que reveló una gran homología de la región citoplasmática del receptor con el dominio de señalización del receptor de IL-1 en mamíferos. Por esta razón, se denominó Toll/IL-1R (TIR).¹⁰⁰

Los TLRs se expresan fundamentalmente en las células del sistema inmune: linfocitos, monocitos, neutrófilos, etc., pero también son expresados en otras estirpes celulares como células epiteliales y endoteliales. En mamíferos existen al menos 10 TLRs, cada uno de los cuales parece ejercer una función específica en el reconocimiento inmune innato. Se expresan en diferentes regiones dentro de la célula; los TLR1, TLR2 y TLR4, y TLR6 se expresan en la membrana celular. Por su parte, los TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 se expresan en compartimentos celulares como los endosomas. La activación de estos últimos requiere la maduración del endosoma (**Figura 11**).

Como hemos descrito, los TLRs detectan la presencia de agentes exógenos (infecciosos) o endógenos (que provienen del daño celular) mediante el reconocimiento de PAMPs. Algunos ejemplos de PAMPs exógenos son el lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram-negativas, el peptidoglicano de bacterias gram-positivas, la flagelina, determinadas secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) microbiano y el ácido ribonucleico (ARN) de doble cadena que producen la mayoría de los virus durante su ciclo replicativo.

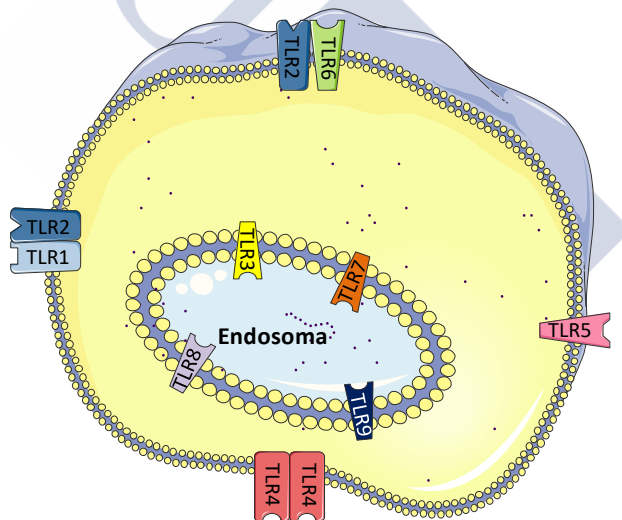


Figura 11: Localización celular de los TLRs.

Pero también se han descrito otros ligandos endógenos no derivados de agentes infecciosos que interactúan por igual con los TLR, como las proteínas de choque térmico (HSP), la cFn, lactoferrina (Lf), derivados de influencia hormonal, ácidos grasos insaturados, ARNs y ADNs celulares, etc; que actúan como ligandos endógenos de los TLR2 y TLR4 (**Figura 12**).⁹⁶

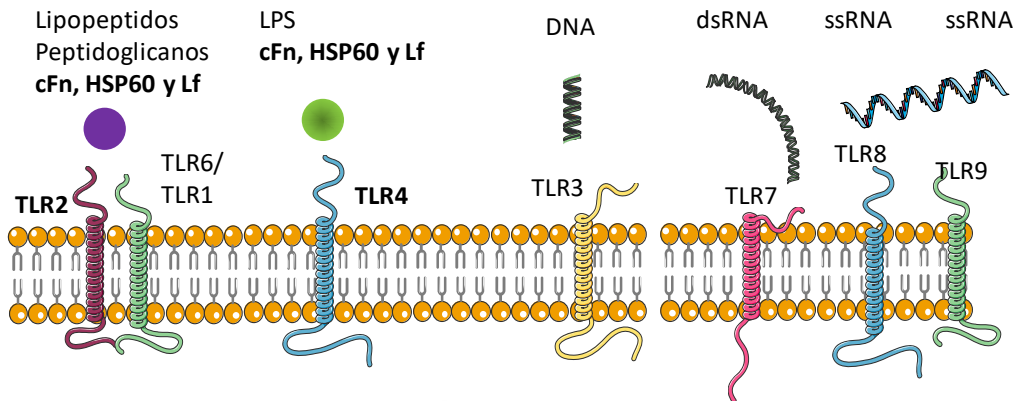


Figura 12: Principales ligandos exógenos y endógenos de los TLRs. Destacar el papel de cFn, HSP60 y Lf como ligandos endógenos de TLR2 y TLR4.

El listado de ligandos endógenos de los TLRs publicados se sigue incrementando en la actualidad. Hasta el momento no está todavía claro cuál es su función en la homeostasis y/o en la enfermedad. Sin embargo, se ha sugerido que estos ligandos endógenos actúan como “señales endógenas de peligro” que, si se produce un daño celular, son reconocidos por los TLRs.¹⁰¹ Por lo tanto, los TLRs desempeñan un papel fundamental en el reconocimiento extracelular de PAMPs,^{102,103} y contribuyen al proceso fisiopatológico de muchas enfermedades autoinmunes o que representan una respuesta fisiológica al daño tisular.

Las vías de señalización mediadas por los TLRs se han estudiado principalmente en TLR2 y TLR4 y han demostrado ser muy similares a las vías de señalización utilizadas por el receptor de la IL-1 (IL-1R).¹⁰⁰ Básicamente, la unión de los ligandos a sus receptores activa las vías de señalización mediadas por el gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MyD88), proteína adaptadora que contiene un dominio C-terminal y un dominio de muerte N-terminal que media la unión del TLR al IL-1R. A través de este dominio de muerte, MyD88 interactúa con IRAK e IRAK2. IRAK activado se une a su vez a otra proteína adaptadora, la proteína transformadora de la tirosina quinasa-6 (TRAF6) que activa al factor de transcripción nuclear kappa beta (NF- κ B), y las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK). TRAF6, específicamente permite la degradación de la enzima I κ B por la activación del inhibidor de kinasas (IKK) lo que permite que NF- κ B se trasloque al núcleo (**Figura 13**).¹⁰⁰ También existen otras vías de señalización independientes de MyD88 que puede activar PI3K/Akt¹⁰⁴ pero no son TLR-dependientes.⁹⁶

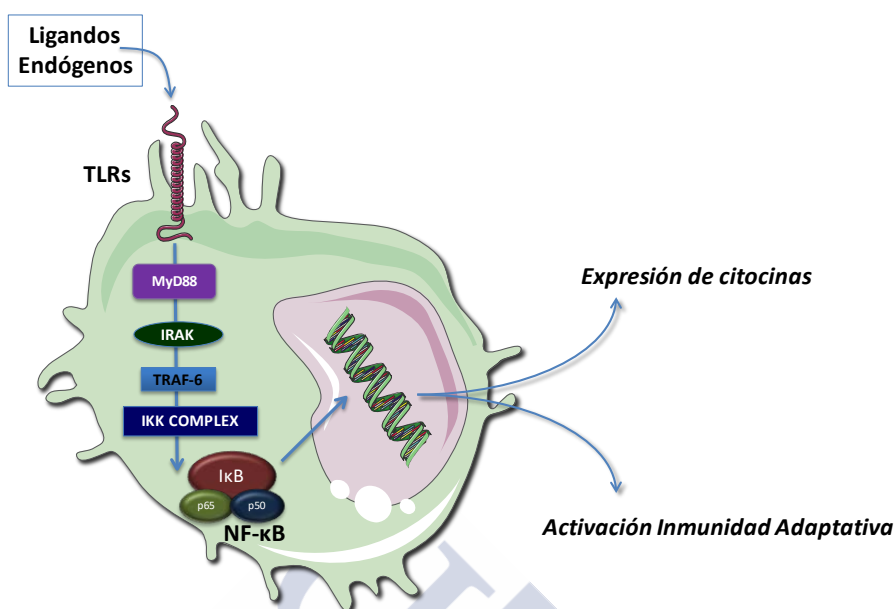


Figura 13. Esquema de las vías de activación de los TLRs a través de MyD88.

Las consecuencias de la traslocación de NF-κB al núcleo están bien estudiadas. Media la expresión de genes inflamatorios como el óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2), así como la liberación de citoquinas proinflamatorias (IL-1, TNF-α, IL-6), la liberación de moléculas de adhesión como la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1), la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1), etc. En definitiva, se pone en marcha la RI secundaria a la respuesta inmune innata. Curiosamente, también se sabe que NF-κB puede poner en marcha importantes vías de protección, especialmente antiapoptóticas.¹⁰⁵

En el ojo se ha detectado expresión de TLR4 en varios tejidos y células, incluyendo las células epiteliales corneales y conjuntivales, así como en los fibroblastos del estroma corneal. El TLR2 también es expresado en células epiteliales corneales y conjuntivales humanas.¹⁰⁶ El TLR2 juega un papel activo en la respuesta inflamatoria crónica al *Staphylococcus aureus* en las células epiteliales conjuntivales. El tratamiento de las células epiteliales corneales con anticuerpos TLR2-neutralizantes produce un descenso significativo de citoquinas proinflamatorias como la IL-6, IL-8 y TNF-α.¹⁰⁷ Este hecho sugiere que los TLRs pueden desempeñar un papel inmunomodulador precoz, que podría modularse en fases tempranas de la enfermedad a través del bloqueo de ligandos endógenos o mediante la utilización de anticuerpos neutralizantes.

1.4.4.4. Control de la respuesta inflamatoria

El control de la respuesta inflamatoria se basa en un mecanismo de autorregulación (coexisten elementos estimuladores e inhibidores). Todo ello se desarrolla de manera compleja con numerosas interacciones, algunas de ellas todavía no bien conocidas. En todo caso, cuando se alcanza el máximo desarrollo de una RI se ponen en marcha una serie de mecanismos moduladores encaminados a controlar/neutralizar una respuesta inflamatoria exacerbada. La potencia de estos mecanismos está en consonancia con el nivel de agresión de los mecanismos que los generaron. Algunos ya los hemos mencionado, pero para nuestro estudio queremos destacar la Lf, que posee propiedades multifuncionales a nivel sistémico y local, como actividades antiinflamatorias y antimicrobianas, jugando un papel esencial en el mantenimiento de la salud ocular.¹⁰⁸ Además de su actividad antimicrobiana, participa, como un componente esencial, en la inmunidad innata y tiene una repercusión sobre la regulación de ésta. Las propiedades antiinflamatorias de la Lf se deben, en parte, a la inhibición de la vía de activación del complemento y a su unión al hierro libre presente en lágrima, esencial para el crecimiento bacteriano.¹⁰⁸

1.5. FISIOPATOLOGÍA DEL QUERATOCONO: ESTADO ACTUAL

Como ya hemos mencionado, los hallazgos histopatológicos clásicos del QC los constituyen el adelgazamiento estromal, la rotura de la membrana de Bowman y el depósito férrico subepitelial. De todos ellos destaca la alteración de la arquitectura fibrilar estromal, con incremento de contenido en proteoglicanos, reducción del diámetro fibrilar y desorden en los paquetes fibrilares.¹⁰⁹ En una primera hipótesis fisiopatológica del QC basada en alteraciones moleculares y bioquímicas, se propuso que: a) Existe un procesamiento anómalo de los radicales libres y superóxido en las córneas queratocónicas; b) Existe un aumento de aldehídos a nivel de la superficie ocular; c) Las células dañadas sufren un proceso irreversible de apoptosis; d) Las células dañadas de forma reversible dan lugar a fenómenos de reparación tisular.¹¹⁰

Así pues, los cambios que tienen origen en la córnea deberán poder ser explicados por diversos mecanismos fisiopatológicos, tales como:

- 1) Inflamación.
- 2) Destrucción de la matriz extracelular.
- 3) Daño por estrés oxidativo.
- 4) Apoptosis.
- 5) Factores genéticos.

1.5.1. Inflamación

En los últimos años se han añadido nuevas evidencias que implican la inflamación en la fisiopatología del QC. La degradación del tejido por alteraciones estructurales como su adelgazamiento, hecho que ocurre en el QC, implica la expresión de mediadores inflamatorios, como las citocinas proinflamatorias, moléculas de adhesión celular y MMPs. Estudios moleculares en lágrima se ha demostraron que en los ojos con QC están incrementadas algunas moléculas proinflamatorias como la IL-6, TNF- α y MMP-9, y en proporción directa al grado de evolución del QC.¹¹¹ Además, en pacientes con QC que portaban lentes de contacto rígidas permeables a los gases (LCR), los niveles de estas moléculas proinflamatorias estaban incrementados en comparación con miopes con el mismo tipo de lentes. Esto sugiere que los ojos con QC presentan una capacidad de respuesta inflamatoria, o una susceptibilidad a ésta, superior a la de sujetos normales.¹¹² Asimismo, estos hallazgos pueden explicar los síntomas de picor que experimentan los pacientes, sobre todo al retirar las lentes de contacto. Por otra parte, se ha evidenciado que los queratocitos de córneas con QC presentaban una expresión de receptores de IL-1 cuatro veces superior a las córneas normales. Se ha demostrado que la IL-1 induce apoptosis *in vitro* en queratocitos estromales obtenidos de pacientes con QC.¹¹³ Trabajos posteriores demostraron que los pacientes con QC sobreexpresan citocinas proinflamatorias en lágrima,^{111,114} y que la sobreexpresión de IL-6 y TNF- α está relacionada con el grado de progresión del QC.¹¹¹

1.5.2. Destrucción de la matriz extracelular

Uno de los rasgos más significativos del QC es el adelgazamiento corneal progresivo que resulta de la pérdida de los componentes estructurales de la córnea, entre los que destaca la destrucción de la matriz extracelular. Las córneas con QC exhiben un incremento de la actividad enzimática de la MMPs o, en su defecto, un desequilibrio en la acción de sus inhibidores (TIMP-1, del inglés tissue inhibitor of metalloproteinase). La actividad colagenolítica en la córnea es muy compleja y de difícil análisis. Además, dentro de una misma córnea pudieran estar ocurriendo procesos diferentes (actividad enzimática o proceso cicatrizal) lo que explicaría los hallazgos no uniformes y en ocasiones contradictorios.¹¹⁵ Así, la activación de MMP-2 está incrementada en todas las formas de QC. Por el contrario, el inhibidor tisular de MMPs (TIMP-1) se sobreexpresa únicamente en las formas cicatrizantes.^{116,117} Estudios previos de nuestro grupo demostraron un aumento muy significativo de la MMP-9 en lágrima de pacientes con QC, siendo el factor predictivo más potente en relación con la progresión de la ectasia.¹¹¹ Sin embargo, en el QC subclínico, estos niveles se mantuvieron en cifras similares a los controles.¹¹⁸ Estos resultados, se comentarán más adelante, ya que sostienen la hipótesis de la degradación de la

matriz extracelular como posible mecanismo etiopatogénico del QC. Sin embargo, las MMPs no se encontraron sobreexpresadas en la ectasia post-LASIK, sugiriendo que otros mecanismos fisiopatológicos están implicados en esta patología.¹¹⁹

1.5.3. Daño por estrés oxidativo

Se han hallado evidencias de daño oxidativo por productos citotóxicos (ROS/ RNS, del inglés reactive oxygen species/reactive nitrogen species) generados por peroxidación lipídica y óxido nítrico.¹²⁰ Por este mismo proceso se reduce la actividad de TIMP-1 e incrementa la de las MMPs.¹²¹ En un estudio *in vitro* en fibroblastos obtenidos de pacientes con QC se ha demostrado una respuesta deletérea exacerbada mediada por estrés oxidativo, manifestada en la disfunción mitocondrial y daño del ADN mitocondrial.¹²² También se han descrito alteraciones en las actividades de glutatión reductasa y de glutatión-S transferasa. La presencia frecuente de un depósito de ferritina (anillo de Fleischer) representa una disfunción del metabolismo del hierro, aunque se desconoce el papel que juega dentro de la disfunción corneal,¹²³ pero podría explicar la razón por la que el hierro es un co-factor requerido en la formación de hidroxilisina, que afecta al diámetro de las fibras de colágeno corneal. La expresión de hidroxilisina es menor en el QC que en córneas normales.¹²⁴

1.5.4. Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada requiere de una cascada de señales mediadas por caspasas, una familia de proteasas de cisteína. Los fibroblastos corneales en el QC muestran una activación incrementada de la vía de las caspasas, inducidas por estrés oxidativo.⁷¹ En el QC existen procesos de muerte celular programada a nivel de los queratocitos. Sin embargo, al demostrarse únicamente en el 66% de las córneas estudiadas en pacientes con QC, se pone en duda la implicación de la apoptosis en la patogenia del QC. Así, en el estroma anterior se ha localizado una mayor alteración del balance de TIMP-1 y TIMP-3, que es precisamente en donde se encuentran más células apoptóticas.¹²⁵ Estos datos fueron confirmados mediante el estudio de córneas de QC por microscopía confocal, encontrando una menor densidad de queratocitos, proporcional al grado evolutivo del QC.¹²⁶ La apoptosis también afecta a las células de epitelio y del endotelio corneal.^{113,127}

Estudios posteriores de nuestro grupo demostraron una disminución de los niveles de Lf en la lágrima de los pacientes con QC (**Figura 14**), así como disminución de la inmunoglobulina G constante Kappa (IGKC, del inglés immunoglobulin G kappa constant) y Zinc- α 2-glicoproteína (ZAG, del inglés zinc- α 2-glycoprotein).^{118,128} Estos resultados sugieren que en la patogénesis de la

ectasia pueden estar implicados procesos inmunológicos. La Lf, como hemos comentado anteriormente, modula a nivel sistémico y local la función de componentes humorales y celulares de la respuesta innata y adaptativa. A través de su interacción con diversos receptores, la Lf induce vías de señalización extracelular e intracelular que implican los receptores TLR, que regulan la expresión de genes involucrados en la producción de citoquinas y otros mediadores inflamatorios, mediando efectos antiapoptóticos.^{108,104}

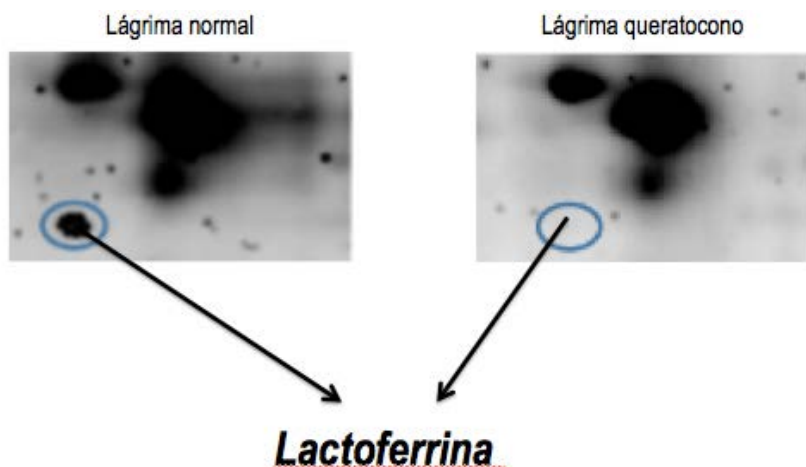


Figura 14. Estudio proteómico donde se observa una disminución en lágrima de Lf en pacientes con QC.¹¹⁸

1.5.5. Factores genéticos

Los estudios genéticos del QC ayudaron a indagar en su fisiopatología y cronobiología. La conclusión del proyecto genoma humano y el rápido desarrollo de bases de datos y algoritmos informáticos, ha tenido un gran impacto en la investigación biomédica, posibilitando el estudio a gran escala de genes y proteínas. A este avance tecnológico no fue ajeno el QC. La búsqueda de genes responsables del QC está generando una gran actividad investigadora,¹²⁹ pero sus resultados son poco concluyentes, posiblemente por la etiología multifactorial del QC. Tampoco hay estudios concluyentes a nivel cromosómico.

1.6. ESTUDIO DE BIOMARCADORES ASOCIADOS AL QC

Los estudios de biología molecular en el QC han permitido identificar una serie de posibles biomarcadores candidatos a participar en la fisiopatología de esta enfermedad. La etiología multifactorial del QC hace que se hayan

identificado muchos genes y proteínas implicados en su naturaleza. Los principales biomarcadores asociados al QC son los siguientes:

1.6.1. Genes codificadores del colágeno

El QC se ha relacionado a enfermedades asociadas al colágeno, sugiriendo que una alteración del colágeno pudiera ser subyacente a la fisiopatología de la enfermedad. En la córnea se expresa colágeno tipo I, III, IV, V, VII y VIII, pero no se ha evidenciado ninguna alteración genética significativa en los mismos asociados al QC.³⁰

1.6.2. Metaloproteasas de Matriz y sus inhibidores

La importancia de las MMPs en la fisiopatología del QC es controvertida. Zhou et al¹³⁰ describieron un incremento de expresión y actividad de las catepsinas B y G, pero no de otras enzimas como la uroquinasa, las MMPs y los inhibidores de MMPs (incluyendo TIMP-1, TIMP-2, alfa1quimotripsina, alfa2 antiplamina y el inhibidor del activador del plasminógeno 1). Por el contrario, Brown et al¹²¹ demostraron que el incremento de productos resultantes del estrés oxidativo incrementa la actividad de la MMP-9 y un descenso de la actividad de su inhibidor TIMP-1.^{70,111} Estos resultados permiten la asociación de dos de las rutas moleculares típicamente relacionadas en la fisiopatología del QC, el estrés oxidativo y las MMPs. Sin embargo, estos estudios se han realizado en corneas de pacientes con QC tras QP, por lo que la expresión de MMPs se determina en etapas tardías de la enfermedad y, por lo tanto, se desconoce su posible implicación en estadios precoces y durante el curso de su evolución. En este sentido, Smith et al¹¹⁶ demostraron que la expresión de MMP-2 estaba incrementada en córneas de pacientes con QC no muy avanzado, sin incremento de la TIMP-1 y TIMP-2. A medida que evolucionaba el QC, la mayor expresión de MMP-2 se acompañaba de un incremento del TIMP-1 que intentaba contrarrestar sin éxito la actividad de la proteasa. Asimismo, el incremento de TIMP-3 soluble también se ha demostrado en el QC. Pero curiosamente, la unión de TIMP-3 soluble con MMPs inducía apoptosis de las células del lugar donde se depositan, contribuyendo a la evolución del QC.⁶⁸

Se han estudiado otras moléculas asociadas con las MMPs en el QC. La MMP de membrana tipo 1 (MT1-MMP, del inglés membrane type 1-matrix metalloproteinase) es una proteína que tiene la capacidad de activar MMP2, además de degradar directamente la matriz extracelular. Se ha demostrado que la expresión de la MT1-MMP está incrementada en el QC.¹³¹

Tal como se ha comentado anteriormente, la actividad de las MMPs puede ser inhibida por los TIMP.^{70,74} Además de sus funciones como inhibidores de las

MMP, Matthews et al⁷¹ demostró que el TIMP-1 puede ejercer una actividad antiapoptótica y, por el contrario, el TIMP-3 presenta actividad proapoptótica, pudiendo incidir en la génesis y evolución del QC. Por lo tanto, el equilibrio entre estos dos inhibidores de MMPs puede inclinar la balanza de la apoptosis o de la supervivencia celular hacia un lado o el otro. Finalmente, la expresión de otro inhibidor de las MMPs – el inhibidor de la alfa 1-proteinasa – que induce el incremento de la expresión del gen del factor de transcripción Sp1 asociado a supervivencia celular, se encuentra disminuida en el QC.¹³²

Estudios más recientes han demostrado un incremento de la MMP-9 en córneas queratocónicas. Este incremento de MMP-9 se ha asociado a otras enfermedades oculares, con una base inflamatoria, como la queratitis ulcerativa periférica, queratitis herpética y síndrome de Sjögren. La MMP-9 es de central importancia en el QC ya que degrada el colágeno de tipo IV, V y VII. Por lo tanto, estos resultados sostienen la hipótesis del papel de la MMP-9 en la degradación de la matriz extracelular, y consecuentemente su implicación como un posible biomarcador asociado a la patogenia y progresión del QC.¹³³ Esta hipótesis también es apoyada por un estudio realizado en QC unilateral, donde Lema et al¹¹⁸ demuestran niveles elevados en lágrima de IL-6, TNF- α (en ambos ojos) con respecto al grupo control. Sin embargo, los niveles de MMP-9 sólo se encontraron elevados en el ojo QC, presentando el ojo contralateral unos niveles de expresión de MMP-9 similares al grupo control (**Figura 15**).

RESPUESTA LACRIMAL

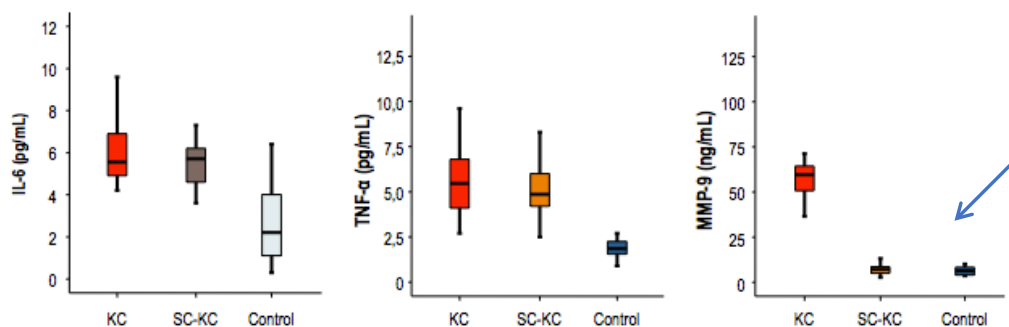


Figura 15. Niveles de IL-6, TNF- α y MMP-9 en lágrima en ojos con QC (KC), QC Subcínico (SC-KC) y control.¹¹⁸

Por último, cabe destacar al factor de transcripción de la familia krüppe 61 (KLF6, del inglés krüppel-like factor 6) que desempeña un papel importante en salvaguardar la integridad del epitelio corneal, disminuyendo la expresión del gen inhibidor de la alfa 1 proteasa, que es uno de los inhibidores de las MPPs que

degradan el estroma corneal. KLF6 presenta un incremento global de su expresión en el QC, pudiendo estar implicado también en su fisiopatología.¹¹⁵

1.6.3. Biomarcadores inflamatorios y asociados a inmunidad

La IL-1 induce apoptosis tanto en los queratocitos como de células epiteliales en el QC.^{30,2} La IL-1 es liberada desde las células epiteliales tras daño mecánico o por estrés oxidativo, difunde a través del estroma superficial, activando e incrementado la expresión de sus receptores (IL-1R).¹³⁴ La sobreexpresión de IL-1R se ha demostrado en fibroblastos de QC,¹³⁵ haciéndolas todavía más sensibles al daño inducido por IL-1. La IL-1, además, induce a las MMP-1, MMP-3 y MMP-9, exacerbando el daño inducido a nivel corneal.^{136,137}

La sobreexpresión de la IL-6 en lágrima también ha sido demostrada en pacientes con QC y, lo que es más importante, está sobreexpresión de IL-6 está asociada al grado de progresión de la ectasia. Al igual que la IL-1, la IL-6 induce la expresión de MMPs.^{111,115}

Por otro lado, estudios proteómicos del epitelio corneal evidenciaron una diferente expresión de tres proteínas en el QC: la gelsolina, la S100A4 y la alfa-enolasa. La gelsolina y la S100A4 están relacionadas con el citoesqueleto, mientras que la alfa-enolasa se asocia con una posible función cristalina para ajustar el índice refractivo epitelial, con lo que podrían también estar implicadas en la fisiopatología del QC.¹³⁸ A nivel de lágrima se encontraron tres proteínas infra-expresadas en los pacientes con QC con respecto a sujetos sanos: ZAG, Lf e IGKC.¹³⁹ Como ya se comentó anteriormente, estas proteínas forman parte de la respuesta inmune e inflamatoria, principalmente la Lf, destacando por su aspecto inmunomodulador sobre la respuesta inflamatoria mediante su unión a los receptores LPS y CD14 de la membrana celular, para finalmente unirse al TLR-4. Se sugiere que tiene un efecto modulador sobre dicha respuesta con capacidad de inhibir la producción de mediadores pro-inflamatorios (**Figura 16**). Por lo tanto, la Lf puede ejercer un papel crucial en el inicio y progreso del QC a través del sistema inflamatorio y de la inmunidad innata.

1.6.4. Factores tróficos y estrés oxidativo

Lambiase et al¹⁴⁰ realizaron un estudio pionero para testar las alteraciones de la vía del factor de crecimiento neural (NGF, del inglés nerve growth factor) en córneas con QC. Sus resultados demuestran la falta de expresión del receptor de NGF (TrkA o NGFR) y una reducción significativa de la expresión tanto del propio NGF como de otro de sus receptores, p75NTR. Esta falta de expresión de TrkA/NGFR parece ser exclusiva del QC y está mediada por el represor transcripcional Sp3 debido a un incremento de su isoforma corta. Esa falta de

expresión de TrkA/NGFR se reduce únicamente a tejido corneal, siendo en el resto del organismo completamente normal.¹⁴⁰ El papel crucial que juega el NGF en el mantenimiento del trofismo corneal y en el equilibrio entre diferenciación y proliferación celular hace que esta vía sea de especial interés. La ausencia de TrkA en presencia de p75 podría condicionar una apoptosis de las células corneales, hecho que ya ha sido documentado en el QC.¹¹³ El posible control de la regulación de esta vía puede ser una de las estrategias a explorar en el futuro.

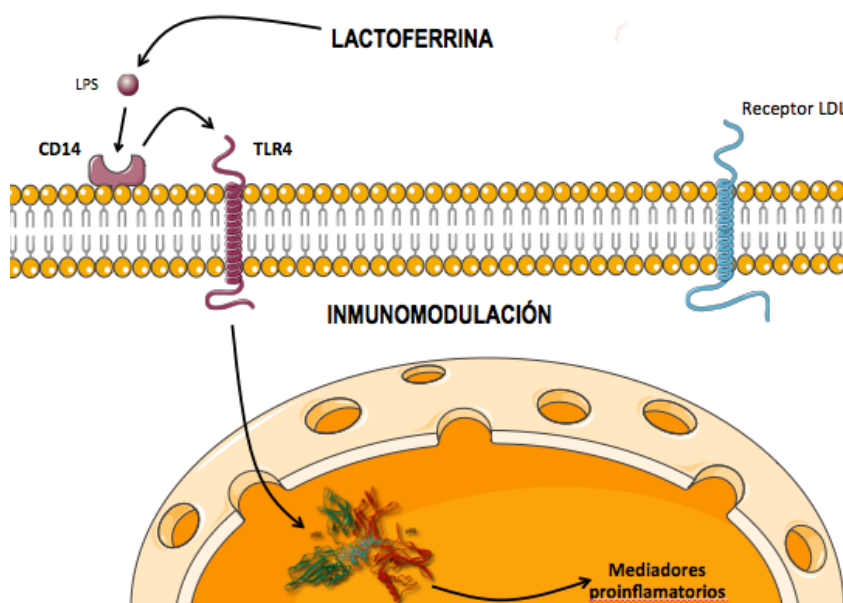


Figura 16. Efecto inmunomodulador de la Lactoferrina.

Por otro lado, el gen de la superóxido dismutasa 1 (SOD1, del inglés superoxide dismutase 1) ha sido asociado a la fisiopatología del QC. La delección en el intrón 2 de la SOD1 se ha encontrado en un par de familias afectadas de QC.⁸² Su localización en el cromosoma 21, implicado también en síndrome de Down que cursa con una incidencia más alta de QC, y el hecho de que sea una importante enzima antioxidante apoyan su posible implicación causal en el QC.

I) INTRODUCCIÓN

II) JUSTIFICACIÓN

III) HIPÓTESIS

IV) OBJETIVOS

V) MATERIAL Y MÉTODO

VI) RESULTADOS

VII) DISCUSIÓN

VIII) CONCLUSIONES

IX) REFERENCIAS

X) ANEXOS



JUSTIFICACIÓN

El queratocono (QC) es una ectasia corneal degenerativa y progresiva que afecta a adultos jóvenes (segunda década de la vida) provocando gran incapacidad visual, es una causa de baja visión, con gran impacto socio-sanitario. La incidencia del QC es de 1 en 2.000 en la población general y es la primera causa de trasplante corneal en los países desarrollados. Actualmente, no hay tratamiento médico/farmacológico para prevenir el desarrollo o disminuir la progresión del QC, y el tratamiento óptico es cuestionado. En los últimos años se han desarrollado técnicas topográficas que permiten el diagnóstico y la valoración de la evolución de la ectasia con gran precisión, pero no en sus estadios precoces. Además, tanto la etiología, como los factores que determinan el comienzo, la progresión o estabilización de la enfermedad son ampliamente desconocidos.

Evidencias científicas actuales ponen de manifiesto la existencia de una respuesta inflamatoria en los pacientes con QC que pudiera ser inmunidad innata dependiente y estar implicada en el desencadenamiento y progresión del QC.

Por ello, la finalidad del estudio fue demostrar, a nivel tisular (epitelio conjuntival y corneal), la participación de la inmunidad innata, a través del estudio de los niveles de expresión de los receptores toll-like (TLR2 y TLR4), en la patogenia del queratocono (QC) unilateral y su relación con la aparición, progresión y gravedad de la ectasia corneal.



I) INTRODUCCIÓN

II) JUSTIFICACIÓN

III) HIPÓTESIS

IV) OBJETIVOS

V) MATERIAL Y MÉTODO

VI) RESULTADOS

VII) DISCUSIÓN

VIII) CONCLUSIONES

IX) REFERENCIAS

X) ANEXOS



HIPÓTESIS

El queratocono (QC) es una enfermedad que cursa con respuesta inflamatoria (aumento de IL6, TNF-alfa y MMP9) pudiendo estar medida por la activación de los TLRs.

La hipótesis del proyecto postula que la inflamación es el mecanismo central en el desencadenamiento de las alteraciones estructurales que condicionan el inicio y progresión del QC, siendo esta inflamación inmunidad innata dependiente. Por ello, la expresión de TLRs (TLR2 y TLR4) estará exacerbada en células epiteliales de la córnea y conjuntiva de pacientes con QC unilateral en comparación con sujetos control. Asimismo, la expresión de TLR2 y TLR4 en estas células epiteliales de la córnea y conjuntiva de pacientes con QC será mayor a medida que la enfermedad esté más avanzada. Debido a ello, es esperable que el ojo QC presente mayor expresión de TLR2 y TLR4 que el ojo subclínico. Si se confirma esta hipótesis, los TLRs serían buenas dianas terapéuticas en la ectasia corneal, mediante su inmunomodulación por bloqueo con anticuerpos neutralizantes o el bloqueo (Fibronectina celular (cFn)) o activación (Lactoferrina (Lf)) de sus ligandos endógenos.





I) INTRODUCCIÓN

II) JUSTIFICACIÓN

III) HIPÓTESIS

IV) OBJETIVOS

V) MATERIAL Y MÉTODO

VI) RESULTADOS

VII) DISCUSIÓN

VIII) CONCLUSIONES

IX) REFERENCIAS

X) ANEXOS



OBJETIVOS

El **objetivo principal** de este estudio fue demostrar que la expresión de TLR2 y TLR4 en células del epitelio conjuntival bulbar y corneal de pacientes con QC unilateral es mayor que en controles.

Como **objetivos secundarios** nos planteamos:

- 1) Demostrar la relación de la expresión de los TLRs con la aparición y progresión del QC mediante estudios topográficos corneales.
- 2) Demostrar la correlación entre la expresión de TLR2 y TLR4 en células del epitelio conjuntival bulbar y corneal de pacientes con QC y ligandos endógenos (Fibronectina celular (cFn) y Lactoferrina (Lf)) presentes en lágrima.





I) INTRODUCCIÓN

II) JUSTIFICACIÓN

III) HIPÓTESIS

IV) OBJETIVOS

V) MATERIAL Y MÉTODO

VI) RESULTADOS

VII) DISCUSIÓN

VIII) CONCLUSIONES

IX) REFERENCIAS

X) ANEXOS



MATERIAL Y MÉTODO

5.1. DISEÑO Y PACIENTES DEL ESTUDIO CLÍNICO

Estudio de cohortes longitudinal en el que se estudió un grupo de pacientes con queratocono (QC) unilateral (un ojo afectado y el otro subclínico), y un grupo control pareado por edad y sexo; a los que se le aplicó un protocolo clínico, topográfico, aberrométrico y condiciones de extracción de muestras biológicas común (**Anexo 1**). La sección del estudio clínico, topográfico y aberrométrico se realizó en la Unidad de Contactología Clínica del Hospital Provincial de Conxo (Instituto Galego de Oftalmoloxía) del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS). Además, se realizó una extracción de muestra de epitelio conjuntival y corneal por citología de impresión con microesponja oftálmica (obtención de células) y lágrima por filtro de papel en el Laboratorio de Investigación en Neurociencias Clínicas (LINC) del CHUS.

A todos los pacientes y sujetos control, se les proporcionó la información del proyecto por escrito y firmaron el consentimiento informado del estudio aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia (Código: 2015/436).

El estudio incluyó 50 pacientes con QC unilaterales (100 ojos) con edad comprendida entre 18-50 años. El grupo control incluyó 20 sujetos sanos (40 ojos), entre 18 y 50 años, no familiares consanguíneos de los pacientes, sin antecedentes familiares conocidos de QC.

5.2. CRITERIOS DE SELECCIÓN

Se seleccionaron los pacientes y controles que cumplían los criterios de inclusión y no presentaban ninguno de los criterios de exclusión. Además, en ambos grupos, el test de Schirmer debía presentar valores superiores a 10 mm (en 5 minutos) en ambos ojos; y sólo podían presentar un grado de hiperemia conjuntival no superior a 2 en la Escala de Efron.

5.2.1. Criterios de inclusión

5.2.1.1. Grupo control

Los sujetos incluidos en el grupo "Control" no podían presentar alteraciones biomicroscópicas sugerentes de alteración corneal, ni astigmatismo irregular, ni valores topográficos, aberrométricos o retinoscópicos propios de QC o sospecha de QC. (**Figura 17**).

5.2.1.2. Queratocono subclínico

El grupo de QC subclínico, con ausencia de los signos clínicos de QC, valores topográficos propuestos por Rabinowitz y McDonnell:^{33,34} queratometría central dentro de valores normales (< 47.2 D), y de sospecha de QC < 48.7 D; con una asimetría dióptrica de la zona inferior-superior > 1.4 D, pero < 1.9 D. Para los valores aberrométricos tuvimos en cuenta el índice KSS,⁶¹ y los defendidos por Alió y Shabayek¹⁴¹ para ojos normales, cuya media de coma-like es de $0.35 \mu\text{m}$. Valores del punto de mínimo grosor no inferiores a $490 \mu\text{m}$ y de elevación posterior no superiores a $0,045 \text{ mm}$, tomando como referencia los valores de Rao et al,¹⁴² exigiendo también un KPI por debajo de $0,23\%$,³⁵ una AV espontánea o con compensación esfero-cilíndrica no superior a 1.50 D de $1,0$ (decimal Snellen) (**Figura 17**).

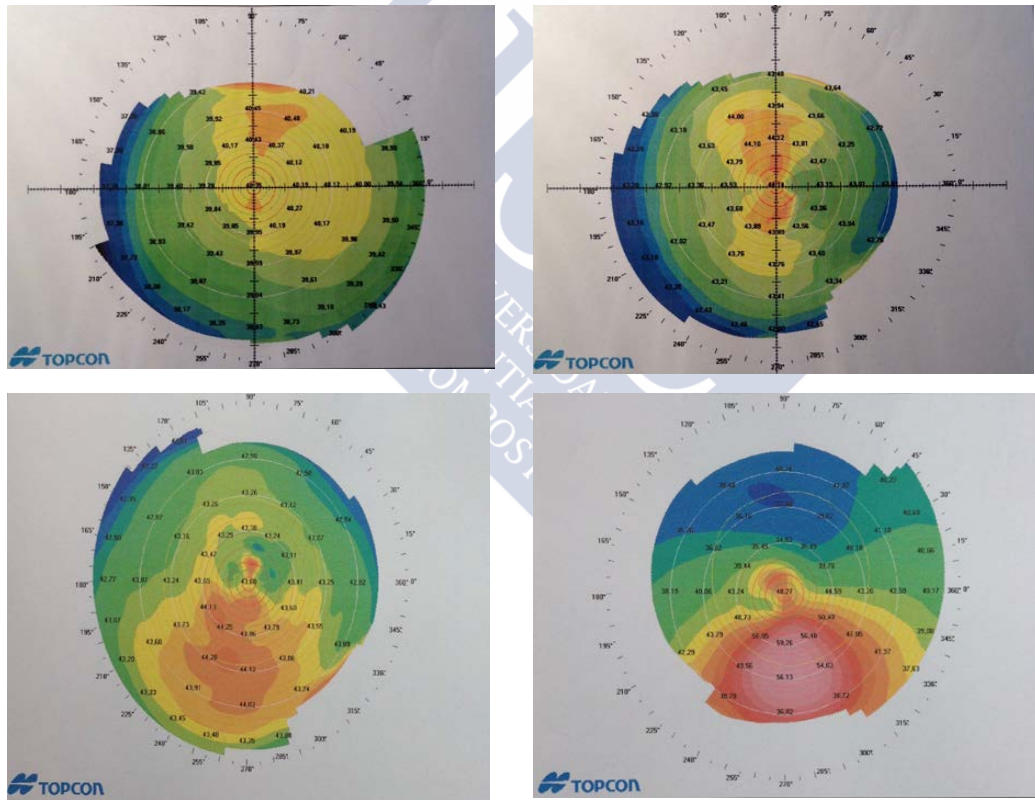


Figura 17: Ejemplos topográficos de control y paciente. Las dos VQ superiores corresponden a un sujeto del grupo control, las inferiores a un paciente (izquierda al grupo subclínico y la derecha al grupo QC).

5.2.1.3. Queratocono manifiesto

Los ojos con QC manifiesto cumplieron los criterios de diagnóstico clínico, los topográficos de Rabinowitz-McDonell,^{33,34} los aberrométricos de Amsler-Krumeich^{36,141} y el índice KSS.⁶¹ La evolución o estadio del QC se valoró con la clasificación de CLEK.¹⁸ Se consideraron ojos con QC manifiesto aquellos con una curvatura corneal central $>48.7D$, una asimetría dióptrica inferior-superior $>1.9D$, un KPI $>0.23\%$ ³⁵ y la presencia de uno o más de los signos típicos de la enfermedad.

5.2.2. Criterios de exclusión

Se excluyeron del estudio a pacientes y controles con intervención quirúrgica previa en el segmento anterior, traumatismo corneal o enfermedad córneo-conjuntival; así como enfermedades hepáticas, renales, hematológicas, inmunológicas, alteraciones de la función tiroidea, diabetes descompensada, infecciones en los días precedentes a la obtención de la muestra y tumores sólidos (ya que podrían alterar los valores de los marcadores moleculares de la inmunidad innata). Asimismo, excluimos a aquellos pacientes con inflamación ocular crónica o sistémica activa; o recibiendo tratamientos con fármacos antiinflamatorios sistémicos o locales. El embarazo fue otra condición de exclusión en el estudio. En los usuarios de lentes de contacto se solicitó que cesaran el porte de éstas una semana antes de la valoración clínica y la toma de muestras, así como a los usuarios de lágrima artificial o cualquier otro colirio.

5.3. DESCRIPCIÓN DE PARÁMETROS ANALIZADOS Y TÉCNICAS

5.3.1. Historia y exploración clínica

A todos los pacientes y sujetos control se les realizó el mismo protocolo.

Datos de filiación, anamnesis, antecedentes generales, oculares, y antecedentes familiares: tratamientos sistémicos y oculares (lágrimas humectantes, suspendidas una semana antes); *Historia de su QC y antecedentes familiares de QC* de primer y segundo orden (hermanos, padres y primos); *picor* o *frotamiento ocular* frecuente. La calificación subjetiva del picor o frotamiento ocular se subdividió en 3 grupos: leve, moderado o grave; la *condición atópica* se dividió en 2 grupos: leve (incluye pacientes o sujetos con rinitis alérgica y/o alergias perennes) y grave (con asma o dermatitis atópica, asociada o no con rinitis alérgica o alergias perennes).

En pacientes con QC, se añadió la *lateralidad del QC manifiesto* y *tiempo transcurrido desde el diagnóstico* hasta la fecha del estudio. Destacar que hemos

considerado tres intervalos de tiempo desde el diagnóstico: inferior a 6 años, entre 6 y 16 años, y más de 16 años.

La exploración clínica incluyó las siguientes variables: AV *lejana* mediada en una escala decimal desde 0.05 hasta 1.00 en optotipos de Snellen proyectados a 6 m, anotando la AV que alcanzaban con compensación óptica. Con el fin de simplificar el manejo de los resultados de AV, hemos establecido una clasificación del 1 al 4, donde el 1 se corresponde a una visión de (0.90-1.00) y el valor 4 corresponde a (0.30-0.05).

El estudio biomicroscópico valoró el segmento anterior del ojo buscando *signos corneales específicos del QC*: nervios visibles, anillo de Fleischer, estrías de Vogt, leucomas, etc. En los ojos controles y subclínicos también valoramos minuciosamente la presencia o ausencia de otros signos biomicroscópicos corneales. Para cuantificar la gravedad de las condiciones observadas establecimos una comparación con la escala graduada para complicaciones de LC de Nathan Efron (**Figura 18**).

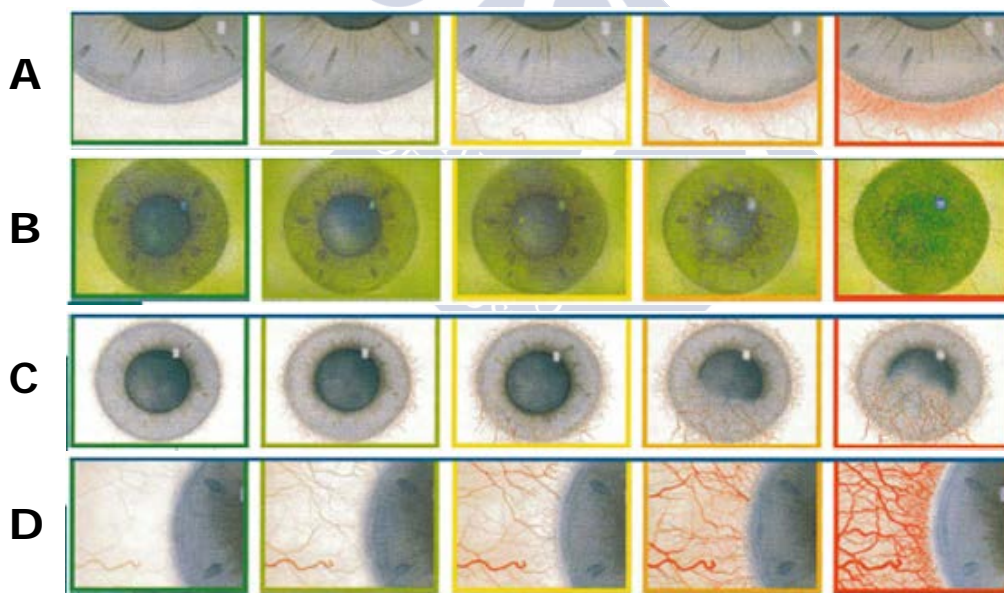


Figura 18. Ilustraciones de Nathan Efron: a) Hiperemia conjuntival, b) Hiperemia limbal, c) Epiteliopatías, d) Neovascularización corneal.

Tomamos como casos clínicamente significativos los que se asemejen a los ilustrados en la escala como grado dos o superior, que se corresponden a los descriptores de gravedad leve, moderado o grave; y respectivamente a código

de color amarillo, naranja y rojo. Para nuestro estudio hemos seleccionado 4 de las complicaciones representadas en la escala: hiperemia conjuntival, hiperemia limbal, epiteliopatías y neovascularización corneal (**Figura 18**).

El instrumental utilizado fue el siguiente: Autorrefractómetro Topcon RM 8000B ATE 600 (nº de serie 206963); Unidad de refracción IS-600 de Topcon (nº de serie 1227386) con biomicroscopio Topcon SL-2 (nº de serie: 1227386) y caja de pruebas con instrumentos de refracción (lentes, gafa de prueba, oclusores). Retinoscopio y Oftalmoscopio Welch-Allyn.

5.3.2. Evaluación topográfica de la córnea

5.3.2.1. Evaluación topográfica y aberrométrica

La evaluación topográfica y aberrométrica se realizó mediante el Videoqueratoscopio [CA-100 Software versión 1.4, TOPCON] (número de serie: 16070132). Este topógrafo analiza la variación de los anillos del disco de Plácido proyectados sobre la córnea respecto a su curvatura estándar, proporcionando un mapa de desviaciones locales. Esto permite la identificación cualitativa del patrón de curvatura mayoritario presente en la superficie corneal anterior. Presenta los resultados en forma de mapas con un código de colores para facilitar su comprensión intuitiva.

Se analizó la morfología de todos los mapas obtenidos clasificándolos en los siguientes patrones: Forma oval, pajarita asimétrica, globo, pezón, patrón en D y pata de cangrejo. Entre estos mapas podemos destacar el de frente de ondas, que incluye el análisis de Zernike, para la aberrometría corneal, especialmente los coeficientes de tercer orden y frecuencia angular impar Z3 (Z310, Z311) asociados a la asimetría en el frente de onda (aberración comática).

Los siguientes parámetros topográficos fueron analizados: PDC, K1, K2, queratometría máxima (Kmax) e I-S. Asimismo, los valores aberrométricos analizados fueron el coma y el coma-like. Con los datos de la queratometría central se completó, en el caso de los pacientes con QC, la clasificación de CLEK.

5.3.2.2. Evaluación topográfica y tomográfica

La valoración topográfica y tomográfica se realizó con el Orbscan II TM, By Orbtex Topcon IT-1 (número de serie: 04000841-03) que combina la técnica del barrido de hendidura (topografía de elevación) con la proyección del disco de Plácido, funcionando de este modo como un sistema topográfico de escaneado en tres dimensiones para el análisis de la superficie corneal anterior y posterior, así

como el espesor corneal y de la cámara anterior (ángulo iridocorneal, diámetro de iris visible, profundidad de la cámara anterior).

Para este estudio fueron considerados relevantes los índices presentados en la presentación principal (Quad-map): mapas de elevación anterior, de elevación posterior, queratométrico y paquimétrico. Los mapas de elevación se obtuvieron restando a la curvatura medida en cada hendidura proyectada sobre la córnea, una curvatura de referencia que puede ser esférica o con perfil variable (elíptica, parabólica etc.). Esta técnica permite una detección precoz de las formas subclínicas de QC, así como cambios ectásicos secundarios a procedimientos refractivos.

Las variables topográficas y biométricas analizadas fueron: elevación posterior, paquimetría central y punto de mínimo grosor.

5.3.3. Evaluación molecular y celular

Se recogieron muestras de lágrima, epitelio corneal y conjuntival a todos los sujetos control (los dos ojos) y a los pacientes (ojo subclínico y QC).

5.3.3.1. Recogida de lágrima

La recogida de lágrima se realizó mediante una tira de papel milimetrado de Schirmer (con iluminación mesópica para estimular lo menos posible la lágrima refleja) utilizando guantes para evitar la contaminación de las muestras. La tira de papel se dobla por la escotadura de modo que la zona doblada se introduce en el saco conjuntival inferior en la zona temporal. Una vez situado, el papel va absorbiendo lágrima. Hemos recogido la lágrima hasta alcanzar los 15 mm en el papel milimetrado de Schirmer, con el fin de extraer la misma cantidad de lágrima en todos los pacientes y sujetos control. Se extrajo la tira de papel del saco conjuntival y se guarda en un tubo Eppendorf de 1 mL estéril correctamente etiquetado con el código anónimo del sujeto de estudio y el ojo correspondiente. Finalmente, las muestras se congelan a -80°C en ultracongeladores hasta su evaluación molecular. Las muestras de lágrima fueron utilizadas para la determinación de cFn y Lf.

5.3.3.2. Extracción de células epiteliales corneales y conjuntivales

Se realizó una extracción de muestra de epitelio conjuntival y corneal a todos los pacientes y sujetos control mediante una lanceta oftálmica quirúrgica de espuma de PVA (SOFT CELL®, OASIS®, CA, USA). Previamente a la obtención de la muestra se instaló un colirio con tetracaína al 0,5% y nafazolina al 0,05%. Este anestésico permite una extracción de muestra mucho más

cómoda para el sujeto sin afectar a la muestra. La recogida de la muestra de células epiteliales conjuntivales se realizó en conjuntiva bulbar inferior, próxima al limbo, sin tocar el borde palpebral y corneal en el tercio inferior de la córnea. Mediante una hemosteta, cuyo extremo tiene una microesponja oftálmica, realizamos el raspado conjuntival y corneal. La recogida de muestra siempre se empezó por el epitelio conjuntival y posteriormente el corneal. Al finalizar se administra al sujeto una gota de lágrima artificial en ambos ojos.

La muestra extraída se introduce en un tubo de citometría de 5 mL estéril y libre de nucleasas con 1 mL de PBS+2% FBS. Se agita con un vórtex durante 30 segundos para el desprendimiento de las células y su posterior procesamiento mediante citometría de flujo. Las muestras celulares de epitelio conjuntival y corneal se utilizaron para la determinación de TLR2 y TLR4.

5.3.3.3. Determinación de TLR2 y TLR4

La determinación de la expresión de TLR 2 y TLR4 se realizó mediante citometría de flujo. Las muestras celulares extraídas, tras su agitación en vórtex durante 30 segundos, se dejaron reposar 15 minutos para que las células sedimenten en el tubo de citometría y se proceda a retirar la microesponja. Brevemente, la expresión de TLR2 y TLR4 se analizó mediante citometría de flujo directa según la expresión de antígenos de superficie específicos (TLR2 y TLR4). Se marcaron las células con anticuerpos monoclonales anti-TLR2 FITC-conjugados (IMMUNOSTEP, Salamanca, España) y anti-TLR4 PE-conjugados (IMMUNOSTEP, Salamanca, España). Tras la incubación, las muestras se analizaron en un citómetro de flujo-sorter FACS Aria iiu (BD Biosciences, NJ, USA). La expresión de TLR2 y TLR4 en las células epiteliales de conjuntiva (2500 eventos) y córnea (1000 eventos) se analizó mediante el software FACS Diva 6.02 (BD Biosciences, NJ, EE.UU.). Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) (**Figura 19**).

El coeficiente de variación intraensayo, obtenido por un único investigador que realizó el estudio celular, y calculado por el análisis de 2 muestras de un mismo paciente, fue de 0.87. El análisis se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación de Neurociencias clínicas del CHUS por un biólogo molecular ciego tanto para los datos clínicos como topográficos.

5.3.3.4. Análisis de Lf y cFn

La lágrima se obtuvo mediante el Test de Schirmer. Este papel de filtro se incluyó en un tubo eppendorf de 1 mL con 300 uL de PBS estéril. Se agitó con vórtex durante 1 minuto para el desprendimiento y disolución de las proteínas en el PBS. Esta muestra se utilizó para la determinación de Lf y cFn mediante kits comercializados de análisis cuantitativo de inmunoabsorción ligada a enzimas

(ELISA), obtenidos de ASSAYPRO, MO, USA; y Abbexa Ltd, Cambridge, UK, respectivamente.

Los coeficientes de variación intra-ensayo e inter-ensayo fueron 4.6 % y 5.9 % para cFn, y para la Lf fueron 5.6 % y 7.9 %. El análisis de estos marcadores moleculares se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación de Neurociencias Clínicas del CHUS por biólogos moleculares, que fueron ciegos tanto para los datos clínicos como topográficos.

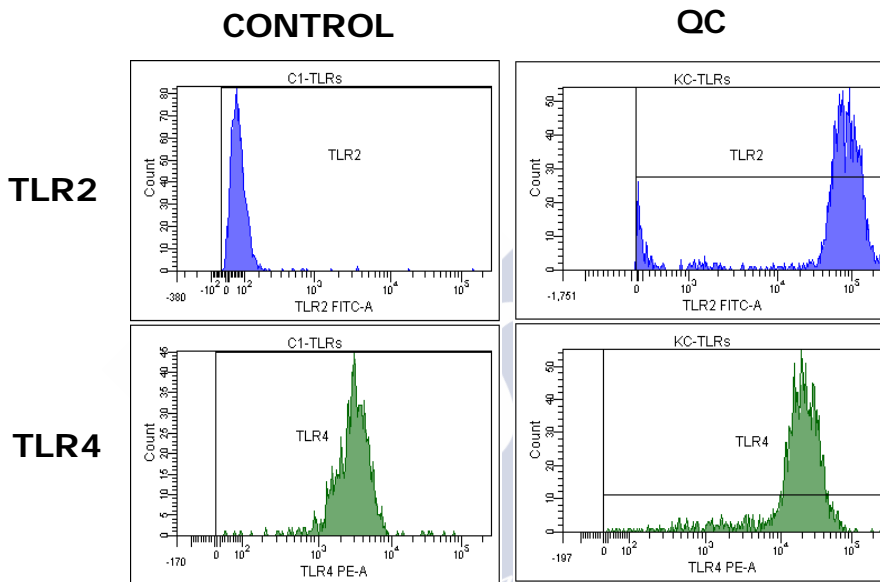


Figura 19. Histograma de citometría de flujo representativo mostrando claramente la mayor expresión de TLR2 y TLR4 en QC.

5.4. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO MUESTRAL

El cálculo de la muestra se realizó por EPIDAT 3.1 (http://www.sergas.es/MostrarContidos_N3_T01.aspx?IdPaxina=62714), estimándose la inclusión de 50 pacientes con QC unilateral (50 ojos subclínicos y 50 con QC) y 19 sujetos control (38 ojos sanos), aceptando un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0.05$) y potencia del 80% ($\beta=0.8$).

5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La descripción de las variables continuas se realizó mediante la media y desviación estándar en caso de distribución normal, y con la mediana y rango de percentiles en caso contrario. Las variables categóricas se describieron mediante

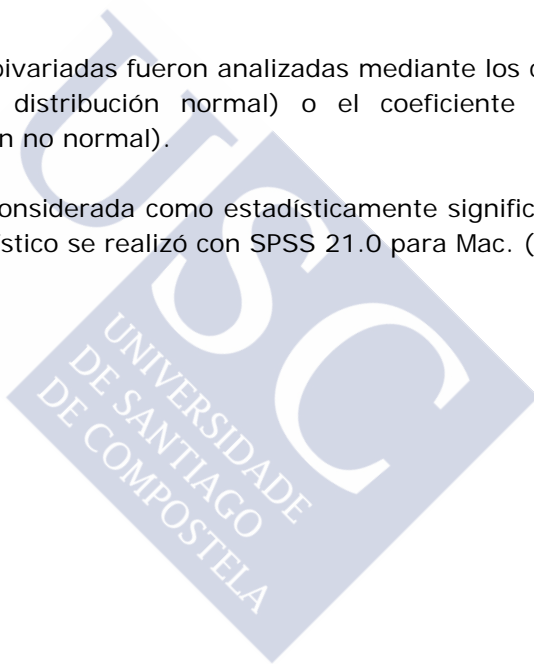
porcentajes. La normalidad de una variable cuantitativa se demostró mediante el test de Kolmogorov-Smirnov.

La comparación bivariada de grupos se realizó con los contrastes de t-Student (variables continuas normales), U-Mann-Whitney (variables continuas no normales) y chi-cuadrado (variables categóricas). El test de ANOVA se utilizó para comparar la expresión de TLR2 y TLR4 entre los grupos de estudio (QC, subclínico y control).

El análisis de Curva COR fue utilizado para determinar el punto de corte más apropiado para predecir el riesgo de aparición o progresión de QC a partir de los siguientes resultados del estudio (expresión de TLR2 y TLR4 en células epiteliales corneales).

Las correlaciones bivariadas fueron analizadas mediante los coeficientes de Pearson (variables con distribución normal) o el coeficiente de Spearman (variables con distribución no normal).

Una $p < 0.05$ fue considerada como estadísticamente significativa en todos los test. El análisis estadístico se realizó con SPSS 21.0 para Mac. (IBM, USA).





I) INTRODUCCIÓN

II) JUSTIFICACIÓN

III) HIPÓTESIS

IV) OBJETIVOS

V) MATERIAL Y MÉTODO

VI) RESULTADOS

VII) DISCUSIÓN

VIII) CONCLUSIONES

IX) REFERENCIAS

X) ANEXOS



RESULTADOS

6.1. RESULTADOS DEL ESTUDIO

6.1.1. Análisis descriptivo

Entre octubre de 2013 y mayo de 2015 se incluyeron de forma prospectiva 50 pacientes consecutivos con QC unilateral y 20 sujetos control. Todos ellos cumplieron con sus respectivos criterios de inclusión y no presentaban criterio de exclusión alguno.

La **tabla 7** muestra las principales características epidemiológicas de la muestra de estudio. No se encontraron diferencias significativas con respecto a la edad y el sexo, mostrando que los grupos de estudio estaban perfectamente pareados. Asimismo, tampoco hubo diferencias respecto al porcentaje de atopía, un factor importante que pudiera estar influyendo en los niveles de TLRs. La mayoría de los sujetos control y pacientes con atopía presentaron una atopía leve (85.7% vs. 76.5%, $p=0.836$). Sin embargo, y como era esperable, el grupo de QC unilaterales mostró un mayor porcentaje de historia familiar de QC, así como la utilización de tratamientos oculares ($p<0.0001$).

Tabla 7. Variables epidemiológicas de los distintos grupos de estudio.

Variable	Control (N=40)	Subclínico (N=50)	QC (N=50)	p
Edad (años)	29.4±6.7	33.0±9.2	33.0±9.2	0.103
Sexo (% hombres)	45.9	64.0	64.0	0.538
Tratamientos oculares (%)	0	36.0	36.0	<0.0001
Historia de QC (%)	0	32.0	32.0	<0.0001
Atopia (%)	35.0	34.0	34.0	0.740

Por otro lado, el tiempo medio transcurrido desde el diagnóstico de QC hasta el momento del estudio fue de 8.3±6.2 años, con un rango que osciló entre 1 y 30 años. Respecto a la subdivisión por grupos realizada según el tiempo transcurrido desde el diagnóstico de QC: 1) menos de 6 años un 42% de los pacientes; 2) entre 6 y 16 años el 46% de los pacientes; 3) > 16 años el 12%. La lateralidad del QC fue mayor en ojo derecho (58%).

En la **Tabla 8** se muestran los resultados relativos a las características clínicas (síntomas y signos) así como las variables topográficas. Los grupos subclínico (62.0%) y QC (66.0%) refirieron mayor picor que el grupo control (35.0%) ($p<0.01$). Este picor fue clasificado según su intensidad en leve y moderado, obteniendo los siguientes porcentajes en los diferentes grupos: el 85.7% de los controles refirieron picor leve, frente a un 77.4 % de los subclínicos y un 69.7 % de los QC; picor moderado únicamente en el 14.3% del grupo

control, un 22.6% en el subclínico y un 30.3% en el QC. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de respecto al frotamiento ocular. Según su intensidad, el 85.7% de los controles refirieron frotamiento leve, encontrando porcentajes similares para el grupo subclínico (86.4%) y QC (72.7%) (**Tabla 8**).

Tabla 8. Variables clínicas (síntomas y signos) y topográficas de los distintos grupos de estudio: control, subclínico y QC.

Variable	Control (N=40)	Subclínico (N=50)	p*	QC (N=50)	p*	p**
Picor (%)	35.0	62.0	0.011	66.0	0.003	0.677
Frotamiento (%)	35.0	44.0	0.386	44.0	0.386	1.000
Signos corneales (%)	50.0	62.0	0.448	100.0	<0.0001	<0.0001
Hiperemia (%)	30.0	64.0	<0.0001	68.0	<0.0001	0.673
PDC (D)	43.5±1.8	43.5±1.6	0.887	49.6±5.9	<0.0001	<0.0001
K1 (D)	42.9±1.9	43.0±1.2	0.730	45.3±3.2	<0.0001	<0.0001
K2 (D)	43.6±1.8	43.9±1.3	0.457	49.3±4.7	<0.0001	<0.0001
Kmax (D)	44.1±1.9	45.1±1.3	0.170	53.4±5.0	<0.0001	<0.0001
I-S (mm)	0.21±0.15	0.77±0.56	<0.0001	5.03±3.00	<0.0001	<0.0001
Coma (µm)	0.19±0.12	0.29±0.56	0.004	1.65±0.74	<0.0001	<0.0001
Coma-Like (µm)	0.24±0.14	0.38±0.56	<0.0001	1.81±0.77	<0.0001	<0.0001
Elev.cara posterior (µm)	0.029±0.009	0.036±0.011	0.005	0.12±0.14	<0.0001	<0.0001
Paquimetría central (µm)	552.0±37.9	524.6±41.8	0.002	476.4±67.2	<0.0001	<0.0001
Punto mín. espesor (µm)	541.0±38.7	513.5±44.4	0.001	457.4±69.0	<0.0001	<0.0001

*Con respecto al control.

** Con respecto al Subclínico.

Con respecto al porte de LC no encontramos diferencias entre los grupos control y subclínico, pero sí con el grupo de QC. El 35% de los controles y el 26% de los pacientes en su ojo subclínico utilizaban lentes de contacto blandas; mientras que el 54% de los pacientes en su ojo QC refirieron el uso de LC híbridas/rígidas ($p=0.011$). Por otro lado, la AV estaba claramente disminuida ($p<0.0001$) en el QC con respecto al control y subclínico que fue del 100%.

No se encontraron diferencias respecto a los signos corneales entre el grupo control (50.0%) y subclínico (62.0). Sin embargo, el 100% de los QC mostraron signos corneales ($p<0.0001$ respecto al control y subclínico) (**Tabla 8**). El signo corneal más destacado en el grupo control y en el subclínico fueron los nervios corneales, mientras un 70 % de los ojos con afectación clínica de la enfermedad presentaban nervios corneales visibles y anillo de Fleischer.

Al analizar la hiperemia conjuntival, observamos que tanto el grupo subclínico (64.0%) como el QC (68.0%) presentaron una mayor frecuencia que el grupo control (30.0%) ($p<0.0001$) (**Tabla 8**). En la escala de Nathan-Efron, únicamente el grupo QC alcanzó el grado 3 (2.9 %). En el resto de grupos, la hiperemia conjuntival medida mediante la escala de Nathan-Efron se encontró entre 0 y 1.

Todos los valores topográficos obtenidos con el VQ (PDC, K1, K2, Kmax, I-S, coma y coma-like) fueron estadísticamente más elevados en el grupo del QC comparado con el subclínico y el control ($p < 0.0001$). Asimismo, el grupo subclínico también presentó valores de I-S, el coma [(Z3,-1) y (Z3,1)] y coma like (RMS alto orden) más elevados que el grupo control ($p < 0.001$) (**Tabla 8**).

De igual modo, respecto a las variables analizadas con el topógrafo de elevación, la elevación de cara posterior fue mayor en el grupo QC comparado con los grupos subclínico y control ($p < 0.0001$). Igualmente, el grupo subclínico mostró una mayor elevación de la cara posterior que el grupo control ($p = 0.005$). Por el contrario, tanto la paquimetría central como el punto de mínimo espesor fueron menores en el grupo QC comparado con el grupo subclínico y control ($p < 0.0001$), encontrándose estas mismas diferencias entre el grupo subclínico y el control ($p < 0.001$) (**Tabla 8**).

Por otro lado, en el grupo del QC se evaluó su grado de evolución según la clasificación CLEK, siendo leve en un 10%, moderado en el 68% y avanzado en un 22%. Finalmente, respecto a la morfología del ojo subclínico, la distribución fue la siguiente: forma oval (32%), pajarita asimétrica (56%), patrón en D (10%) y pata de cangrejo (2%). Con respecto al QC: oval (18%), en pajarita asimétrica (54%), con forma de globo (10%), en pezón (12%), y patrón en D (6%).

En la **Tabla 9** se muestran los valores de expresión de TLR2 y TLR4, tanto en conjuntiva como en córnea, así como los niveles de Lf y cFn en lágrima de los diferentes grupos de estudio.

El grupo QC mostró niveles de expresión de TLR2 y TLR4, tanto en conjuntiva como en córnea, más elevados que el grupo subclínico ($p < 0.05$) y especialmente el grupo control ($p < 0.0001$). Asimismo, en el grupo subclínico la expresión de TLR2 y TLR4 en conjuntiva ($p < 0.05$) y sobre todo en epitelio corneal ($p < 0.0001$) fue mayor que en el grupo control (**Tabla 9**).

Respecto a los marcadores moleculares analizados en lágrima, tanto el grupo subclínico como el grupo QC presentaron menores niveles de Lf que el grupo control ($p < 0.0001$). Sin embargo, no se encontraron diferencias entre el grupo QC y subclínico ($p = 0.644$). Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas entre grupos para los niveles de cFn, si bien el grupo Qc mostró los niveles más elevados (**Tabla 9**).

6.1.2. Análisis de la variable principal: expresión de TLRs

En la **figura 20** se muestran los valores de expresión de TLR2 y TLR4, tanto en células de tejido epitelial conjuntival como corneal, para los diferentes grupos de estudio.

Tabla 9. Niveles de expresión de TLR2 y TLR4 (conjuntiva y córnea) y de Lf y cFn en lágrima de los distintos grupos de estudio: control, subclínico y QC.

Variable	Control (N=40)	Subclínico (N=50)	p*	QC (N=50)	p*	p**
CONJUNTIVA						
TLR2 (UAF)	207.9±130.6	321.8±307.4	0.045	688.6±657.4	<0.0001	0.003
TLR4 (UAF)	1759.3±570.7	2173.8±846.2	0.012	2509.0 ± 883.5	<0.0001	0.043
CÓRNEA						
TLR2 (UAF)	205.2±111.7	1000.7±443.3	<0.0001	2690.3±1550.3	<0.0001	<0.0001
TLR4 (UAF)	1877.5±891.2	2935.4±1256.9	<0.0001	4319.5±1450.2	<0.0001	<0.0001
MARCADORES						
Lf (mg/mL)	1.2±0.6	0.8±0.3	<0.0001	0.8±0.3	<0.0001	0.644
cFn (µg/mL)	747.5±111.3	754.6±94.5	0.202	760.3±103.1	0.071	0.780

*Con respecto al control.

** Con respecto al Subclínico.

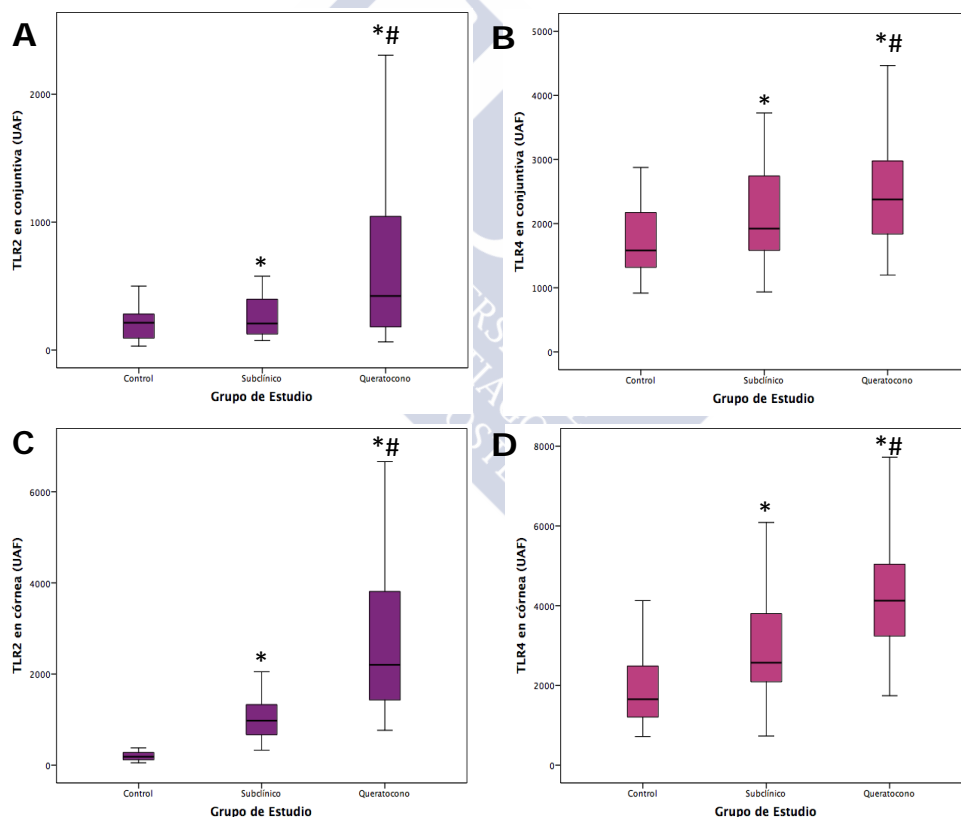


Figura 20. Mediana [cuartiles] de los niveles de expresión de TLR2 (A) y TLR4 (B) en conjuntiva, así como TLR2 (C) y TLR4 (D) en córnea en los grupos de estudio. Un incremento de expresión gradual se observa tanto para el TLR2 y TLR4, especialmente en córnea pero también en conjuntiva: control<subclínico<QC.

*p<0.05 respecto al control; #p<0.05 respecto al subclínico.

Se observa un incremento de expresión gradual, especialmente en córnea pero también en conjuntiva, tanto para el TLR2 como el TLR4: control < subclínico < QC. Estos resultados nos indican que el incremento de la expresión de TLR4, y en especial del TLR2, es mayor cuanto mayor es la progresión del QC. Asimismo, esta asociación se observa más potenciada a nivel de epitelio corneal.

Debido a que la mayor diferencia de expresión de TLRs entre el grupo QC, subclínico y control se encontró para el TLR2 y TLR4 a nivel corneal, los análisis predictivos de inicio y progresión de la enfermedad se realizaron exclusivamente para estos 2 biomarcadores (TLR2 y TLR4 a nivel de epitelio corneal).

6.1.3. Análisis predictivo de riesgo de inicio y progresión de QC

El análisis de Curva COR fue utilizado para determinar el punto de corte más apropiado para predecir el riesgo de inicio o progresión de QC con una alta sensibilidad y especificidad.

De acuerdo al análisis COR, la expresión de TLR2 en células epiteliales corneales puede predecir con alta sensibilidad y especificidad la probabilidad de existencia de QC (QC subclínico + QC) en comparación con los controles (área bajo la curva: 0.995, 95%IC: 0.987-1.000; $p < 0.0001$). Asimismo, la expresión de TLR2 en células epiteliales corneales presenta también utilidad para predecir con alta sensibilidad y especificidad la probabilidad de existencia de un QC subclínico en comparación con un control (área bajo la curva: 0.989, 95%IC: 0.975-1.000; $p < 0.0001$). Finalmente, la expresión de TLR2 corneal presenta igualmente capacidad predictiva para discriminar entre QC y subclínico (área bajo la curva: 0.893, 95%CI: 0.834-0.953; $p < 0.0001$) (**Figura 21**).

A modo de ejemplo, la **tabla 10** muestra diferentes puntos de corte para la expresión de TLR2 en células epiteliales corneales con alta sensibilidad y especificidad para detectar el riesgo de inicio y progresión del QC.

Por otra parte, la expresión de TLR4 en células epiteliales corneales puede predecir también con una alta sensibilidad y especificidad la probabilidad de existencia de QC (QC subclínico + QC) en comparación con los controles (área bajo la curva: 0.846, 95%IC: 0.776-0.915; $p < 0.0001$). Asimismo, la expresión de TLR4 en células epiteliales corneales presenta utilidad para predecir con alta sensibilidad y especificidad la probabilidad de existencia de un QC subclínico en comparación con un control (área bajo la curva: 0.756, 95%IC: 0.653-0.860; $p < 0.0001$) (**Figura 22**). Finalmente, la expresión de TLR4 corneal presenta potencialmente capacidad predictiva para discriminar entre QC y subclínico (área bajo la curva: 0.767, 95%CI: 0.673-0.860; $p < 0.0001$) (**Figura 22**).

La **tabla 11** muestra diferentes puntos de corte para la expresión de TLR4 en células epiteliales corneales con alta sensibilidad y especificidad para detectar el riesgo de inicio y progresión del QC.

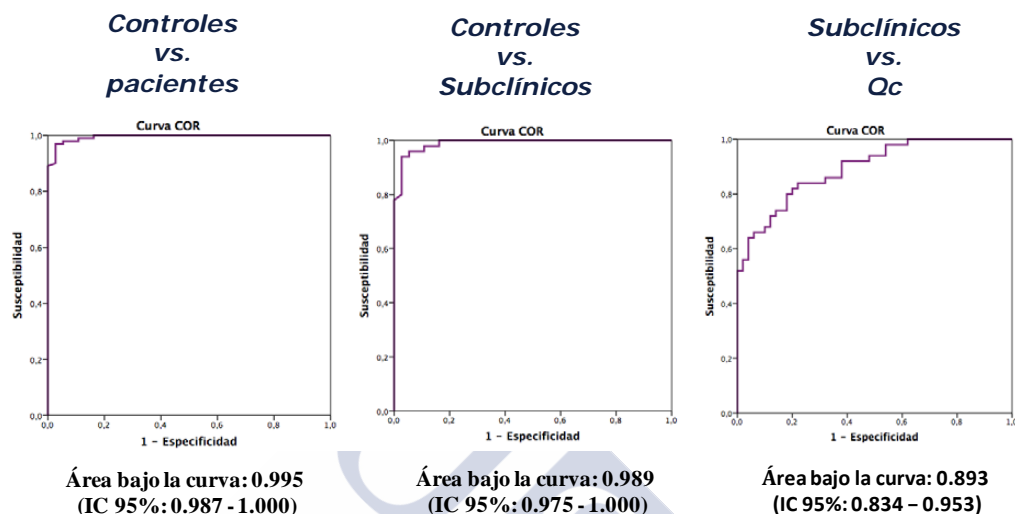


Figura 21: Análisis de curva de COR de la expresión de TLR2 en células epiteliales corneales como predictor de inicio y progreso de QC.

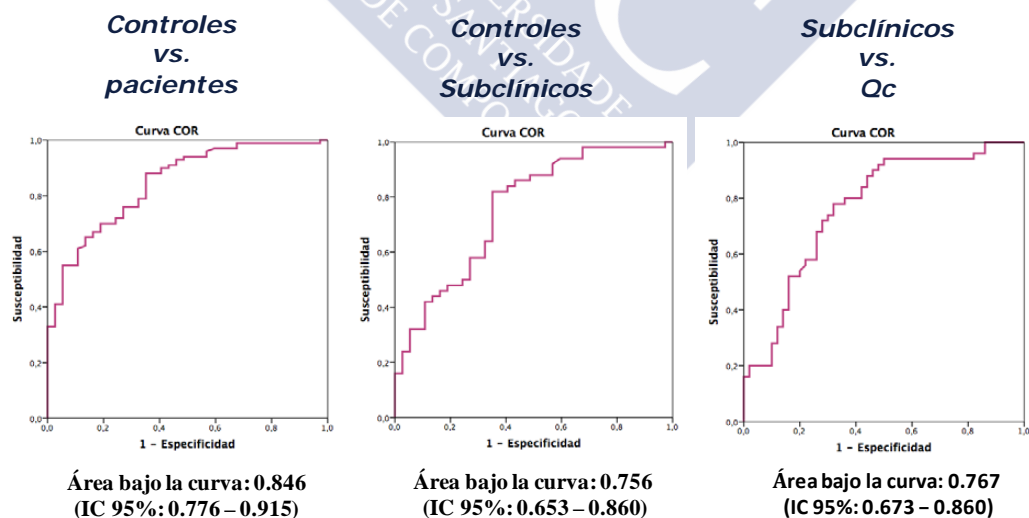


Figura 22: Análisis de curva de COR de la expresión de TLR4 en células epiteliales corneales como predictor de inicio y progreso de QC.

Tabla 10. Sensibilidad y Especificidad para diferentes puntos de corte para la expresión de TLR2 en células epiteliales corneales para detectar el riesgo d inicio y progresión del QC.

Control vs. Pacientes QC (Subclínicos + QC)

Expresión TLR2	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
< 330 UAF	99%	84%
330 – 660 UAF	89-98%	85-99%
> 660 UAF	88%	100%

Control vs. Subclínicos

Expresión TLR2	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
< 330 UAF	98%	84%
330 – 660 UAF	75-97%	85-99%
> 660 UAF	74%	100%

Subclínico vs. QC

Expresión TLR2	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
< 330 UAF	100%	2%
> 660 UAF	100%	26%
660 – 1500 UAF	69-99%	27-87%
> 1500 UAF	68%	88%

Tabla 11. Sensibilidad y Especificidad para diferentes puntos de corte para la expresión de TLR4 en células epiteliales corneales para detectar el riesgo d inicio y progresión del QC.

Control vs. Pacientes QC (Subclínicos + QC)

Expresión TLR4	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
< 1500 UAF	94%	46%
1500 – 4000 UAF	36-93%	45-96%
> 4000 UAF	35%	97%

Control vs. Subclínicos

Expresión TLR4	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
< 1500 UAF	88%	43%
1500 – 4000 UAF	23-87%	39-89%
> 4000 UAF	22%	93%

Subclínico vs. QC

Expresión TLR4	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
< 1500 UAF	100%	22%
> 4000 UAF	52%	80%
> 5000 UAF	28%	90%

Globalmente, podemos concluir que la expresión de TLR2 en células epiteliales corneales muestra la mayor capacidad predictiva para detectar el riesgo de inicio y progresión del QC.

6.1.4. Análisis variables secundarias: progresión QC

Con el fin de observar si los TLRs o sus ligandos endógenos (cFn y Lf) pudieran estar involucrados en la progresión del QC, analizamos su correlación con tres parámetros cuantitativos claramente relacionados con la misma, como son: *K2*, *coma* y *punto de mínimo espesor*. La **Tabla 12** muestra las correlaciones encontradas para cada biomarcador respecto a los parámetros topográficos de progresión de QC: *K2*, *coma* y *punto de mínimo espesor*.

Tabla 12. Coef. de Pearson para cada biomarcador respecto a los parámetros topográficos de progresión de QC: *K2*, *coma* y *punto de mínimo espesor*.

K2

BIOMARCADOR	Coef. de Pearson	p
TLR2 Conjuntiva	0.258	0.002
TLR4 Conjuntiva	0.270	0.001
TLR2 Córnea	0.542	<0.0001
TLR4 Córnea	0.446	<0.0001
Lf	-0.160	0.059
cFn	0.024	0.778

COMA

BIOMARCADOR	Coef. de Pearson	p
TLR2 Conjuntiva	0.308	0.003
TLR4 Conjuntiva	0.229	0.009
TLR2 Córnea	0.673	<0.0001
TLR4 Córnea	0.452	<0.0001
Lf	-0.256	0.002
cFn	0.035	0.679

PUNTO DE MÍNIMO ESPESOR

BIOMARCADOR	Coef. de Pearson	p
TLR2 Conjuntiva	-0.194	0.143
TLR4 Conjuntiva	-0.251	0.003
TLR2 Córnea	-0.475	<0.0001
TLR4 Córnea	-0.337	<0.0001
Lf	0.158	0.062
cFn	0.012	0.889

Existe una correlación fuertemente positiva entre las expresión de TLR2 y TLR4 en ambos tejidos epiteliales, pero especialmente en el corneal, con K2 y coma, dos parámetros topográficos asociados a la progresión del QC ($p<0.001$). Con respecto a los niveles en lágrima de Lf y cFn, únicamente encontramos una correlación negativa entre la Lf y el coma ($r= -0.256$, $p=0.002$).

Por otro lado, la expresión de TLR4 en conjuntiva, así como la expresión de TLR2 y TLR4 en córnea se asociaron negativamente con el punto de mínimo espesor ($p<0.001$). No encontramos correlación para ninguno de los biomarcadores analizados en lágrima (cFn y Lf), ni tampoco para la expresión de TLR2 en conjuntiva.

En conjunto, estos resultados sugieren que los TLRs pueden estar asociados a la progresión del QC y podrían constituir una posible diana terapéutica a explorar.

6.1.5. Análisis variables secundarias: correlación entre TLRs y Lf/cFn

Para testar el posible papel de la cFn y la Lf como ligandos endógenos de los TLRs en el QC, analizamos su correlación. Para observar la correlación existente entre la expresión de TLR2 y TLR4 en células epiteliales conjuntivales y corneales con los niveles en lágrima de cFn y Lf se utilizó el coeficiente de correlación r de Pearson. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Resumen de correlaciones entre la expresión de TLR2 y TLR4, en células epiteliales conjuntivales y corneales, y los niveles en lágrima de cFn y Lf.

GRUPO	MARCADOR	Coef. Pearson		p
TLR2 Córnea	Lf	-0.334	<0.0001	
	cFn	0.280	0.001	
TLR4 Córnea	Lf	0.042	0.628	
	cFn	0.122	0.157	
TLR2 Conjuntiva	Lf	-0.296	0.001	
	cFn	0.197	0.046	
TLR4 Conjuntiva	Lf	-0.119	0.164	
	cFn	-0.077	0.370	

La expresión de TLR2, tanto en córnea ($r=-0.334$) como en conjuntiva ($r=-0.296$), se correlacionó negativamente con los niveles de Lf en lágrima ($p<0.001$). Por el contrario, los niveles de cFn en lágrima se correlacionaron

positivamente con la expresión de TLR2 en células epiteliales conjuntivales ($r=0.197$) y, especialmente, con las corneales ($r=0.280$). No se encontraron asociaciones de estos biomarcadores con la expresión de TLR4. Estos resultados sugieren que la Lf puede actuar como un ligando inhibidor, así como la cFn estimulador, de los receptores TLR2 a nivel corneal y conjuntival.

6.1.6. Análisis variables secundarias: correlación entre TLRs y tiempo desde el diagnóstico del QC

Debido a que la expresión de TLR2 en células epiteliales corneales fue el biomarcador más asociado a la progresión del QC y con más capacidad predictiva, analizamos su asociación con el tiempo desde el diagnóstico de la enfermedad. El perfil de expresión nos muestra que la expresión de TLR2 en córnea aumenta ligeramente entre los 6-16 años de evolución, para posteriormente disminuir en QC con largo periodo de evolución (> 16 años) (**Figura 23**).

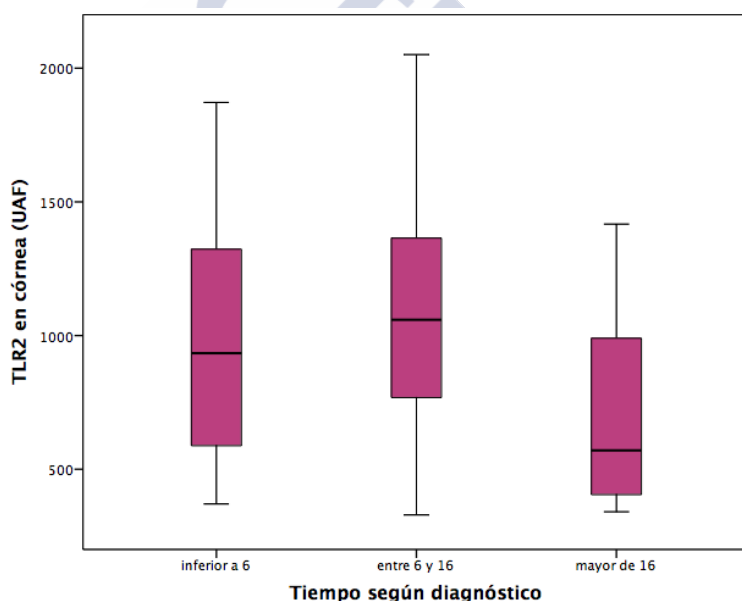


Figura 23: Perfil temporal de la expresión de TLR2 en células epiteliales corneales de pacientes con QC unilateral.

I) INTRODUCCIÓN

II) JUSTIFICACIÓN

III) HIPÓTESIS

IV) OBJETIVOS

V) MATERIAL Y MÉTODO

VI) RESULTADOS

VII) DISCUSIÓN

VIII) CONCLUSIONES

IX) REFERENCIAS

X) ANEXOS



DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue demostrar la participación de la inmunidad innata en el desarrollo del QC, para ello estudiamos pacientes con QC unilateral y un grupo control. Consideramos que nuestra muestra aporta un número de casos suficientes para ser analizada y obtener un tamaño muestral que permita un estudio estadístico válido. Los pacientes fueron seleccionados siguiendo los criterios de inclusión y exclusión. Teniendo en cuenta que la incidencia del QC unilateral en la población general es muy baja, sólo supone aproximadamente el 4% de los QCs,⁵⁴ para seleccionar estos pacientes se necesitó una muestra extensa de historias clínicas.

El Instituto Galego de Oftalmoloxía, dispone del material de exploración especializado para la valoración del diagnóstico de QC unilateral. Varios estudios indicaron que la topografía corneal computerizada es muy sensible para detectar el ligero aumento de curvatura inferior en los QC tempranos.¹⁴³ Bühren analizó las aberraciones de alto orden en ojos sin hallazgos clínicos ni topográficos en pacientes que en el ojo adelfo tienen un QC incipiente, encontrando diferencias significativas entre los ojos de sospecha y normales para los coeficientes Z3-1 y Z5-1.⁴⁹ Nuestro estudio aporta datos sobre la aberración del coma y del coma-like por ser ésta la más representativas para el diagnóstico de QC subclínico. Respecto al equipo de análisis topográfico de elevación de la córnea, podemos comentar que estudios como los realizados por Rao et al,¹⁴² emplearon también como topógrafo el Orbscan II encontrando que la elevación de cara posterior, paquimetría central y punto de mínimo espesor, son buenos índices para la detección precoz.

7.1. VARIABLES EPIDEMIOLÓGICAS, CLÍNICAS Y TOPOGRÁFICAS

El objeto de la discusión de las variables descriptivas (edad, sexo, historias de QC) de los grupos muestrales nos permite evaluar la posible influencia del sesgo de inclusión en los resultados finales, mediante el cual los valores de significación estadística podrían verse influidos por la composición "a priori" de la muestra.

Respecto a la edad de nuestros pacientes, teniendo en cuenta que el inicio de la enfermedad se produce en la adolescencia, presentan una edad media superior a la habitual. La edad media de nuestra muestra se sitúa ligeramente por encima de la de otros estudios,¹⁴⁴ pudiendo afectar esta variable favorablemente a las conclusiones extraídas sobre QC subclínico. El tiempo desde el diagnóstico de QC, en el 54% de los pacientes se encontraba entre los 6 y 16 años y un 12% superior a 16. Si tenemos en cuenta que la probabilidad de que progrese a QC bilateral disminuye a partir de los 6 primeros años,^{145,54} creemos que nuestra muestra, en su mayoría, no progresará a QC bilateral.

Con respecto al género encontramos un predominio del QC en los sujetos varones. En la serie de Hammerstein¹⁴⁶ se evidencia mayor predominio en mujeres, 199 mujeres y 101 varones, pero este estudio se realizó con una muestra de QC bilaterales. Si contrastamos nuestros resultados con otros estudios con afectación unilateral, coincide con nuestro predominio en el sexo masculino.^{147,148} Asimismo, en otros estudios no se encuentra diferencia en el sexo.¹⁴⁹ Nosotros encontramos una frecuencia de historia familiar de QC del 32%, comparada con otros estudios de QC unilateral, este porcentaje es aún más elevado, como el realizado por Stephen J, quien encontró un 8,2% de los casos familiares.¹⁵⁰

Podemos destacar que la frecuencia de enfermedades sistémicas fue superior en nuestros pacientes comparada con el grupo control, así como recibiendo tratamientos sistémicos, aunque dichos tratamientos no interferían en nuestros resultados.

La incidencia de atopia fue similar en ambos grupos. Atribuimos este resultado al criterio de inclusión riguroso que empleamos, ya que queremos demostrar que el sistema inmune en nuestros pacientes está más alterado que los sujetos sanos, y esta variable no va a influir en nuestros resultados. Algo similar ocurre con las LC. La lente de contacto permeable a los gases es el principal tratamiento para los pacientes con QC, lo que hace que haya un mayor número de usuarios de lentillas en el ojo clínico. Debido a que los pacientes con QC tienden a usar LC durante un largo período de tiempo, son más propensos a los cambios de la superficie ocular inducidos por las lentes como; la reducción de la densidad de células epiteliales basales, disminución del espesor corneal y cambio en la curvatura de la superficie sin producirse cambios endoteliales.¹⁵¹⁻¹⁵³ Sabemos que los efectos de las LC en los marcadores inflamatorios y las proteínas aumentan según el tipo de LC.^{154,155} Existen estudios cuyo objetivo fue comparar los cambios inmunohistoquímicos inducidos por dos tipos diferentes de LC en pacientes con QC, comparando usuarios de piggyback contra clearkone híbrida, no siendo capaces de demostrar una diferencia entre los dos tipos de lentes con respecto a las variables examinadas.¹⁵⁶ Sin embargo, se ha demostrado que diversas citocinas (IL-6, TNF- α) están sobreexpresadas en los pacientes con QC usuarios de LC RPG, relacionado con la evolución de la enfermedad.^{112,157-159} Si tenemos en cuenta que la vida media de una célula apical corneal plenamente diferenciada se estima en una semana desde su maduración, creemos que una semana es suficiente para que no interfiera en las muestras biológicas.¹⁶⁰

Del mismo modo, el frotamiento intenso y prolongado de los ojos aumenta el nivel de proteasas y mediadores de inflamación; IL-6, TNF- α y MMP13 en la lágrima de sujetos sanos, de manera similar a la expresada en pacientes con QC establecido.¹⁶¹ En el grupo control coincide el mismo porcentaje de picor y frotamiento, eso nos hace pensar que los que refieren picor son los mismos que

reconocen frotamiento y además se encuentran asociados con el mismo porcentaje de usuarios de LC. En los pacientes el picor es más intenso, sobre todo en el ojo más afectado, sin embargo, el frotamiento es más controlado, ya que son informados en sus primeras consultas de las posibles asociaciones de dicho frotamiento continuado con la progresión de la enfermedad. Se ha descrito que muchos enfermos con QC ejercen un frotamiento intenso en los ojos, la mayoría de ellos no son conscientes e incluso lo niegan al ser interrogados en este sentido. Por ello, han sido con frecuencia los familiares los que refieren que se suelen restregar los ojos habitualmente e incluso son reprendidos por ello. Se ha discutido si el frotamiento intenso de los ojos es uno de los factores que determinan que una ectasia se inicie y se desarrolle, pero su peso en el proceso no está totalmente definido. Aunque se sabe que produce un aumento de las proteasas, la actividad de la proteasa y los mediadores inflamatorios en las lágrimas después del frotamiento ocular puede exacerbarse aún más durante el frotamiento ocular persistente y enérgico observado en personas con QC y esto a su vez puede contribuir a la progresión de la enfermedad.¹⁶¹ Respecto a la lateralidad del QC, ésta mostró predisposición por el ojo derecho. Esto puede ser debido a la dominancia de la mano derecha, coincidiendo así otro estudio.¹⁶²

Es importante señalar que el grupo subclínico, cumpliendo con los criterios de selección, alcanzaban una AV de unidad con la mejor corrección. Este mismo criterio se exigió en el grupo control. Con respecto al examen biomicroscópico del segmento anterior, ambos grupos no presentaron alteraciones, aunque si mostraron nervios corneales, coincidiendo con otro estudio.⁵⁴ En contraposición, el ojo más afectado por la patología presenta los hallazgos clínicos típicos de QC. La hiperemia conjuntival también fue más elevada en los pacientes que en los controles.

La mayoría de los QC se encuentran dentro de la clasificación de CLEK de un estado moderado, no se trata de un estado leve.

En el pasado, la detección temprana del QC se basaba en una medida semicualitativa de distorsión de la curvatura en la superficie anterior de la córnea.²⁸ La videoqueratoscopia ha sido el instrumento más utilizado para la detección de esta enfermedad en la evaluación preoperatoria de candidatos a cirugía refractiva. En nuestro estudio los valores topográficos más relevantes obtenidos con el VQ (poder dióptrico central, meridiano plano K1, meridiano curvo K2 y K máxima), son valores significativamente distintos entre el grupo control y el ojo con QC. Sin embargo, los ojos con afectación subclínica mostraron valores muy similares a los obtenidos en el grupo control, coincidiendo con otros estudios.^{146,163} Hoy sabemos, por estudios anteriores,¹⁶⁴ que los valores aberrométricos ayudan a la detección temprana de la enfermedad y a la valoración de los ojos subclínicos.¹⁶⁵ Nosotros analizamos el coma y el coma-like coincidiendo con otros estudios,^{166,167} dándonos valores

estadísticamente significativos pero la media obtenida en nuestros subclínicos se encuentra dentro de valores normales,^{141,163,168} siendo algo más elevados que los encontrados en QC frustre,¹⁶⁹ pero coincidiendo con estudios realizados con sospechas de QC.¹⁷⁰ Los valores encontrados son los esperados en grupo de QC.¹⁶⁸

La topografía de elevación ha ido ganando relevancia en la detección temprana del QC,^{171,172} sin embargo, los estudios recomiendan varios parámetros para diagnosticar el QC subclínico.¹⁶⁵ La elevación de cara posterior debe combinarse con otros parámetros como los valorados en nuestro trabajo; la paquimetría central y el punto de mínimo espesor. Existe un grado de adelgazamiento significativo entre el grupo control y el subclínico, pero comparando con otros estudios, nuestros valores son más altos,^{173,174} encontrándose dentro del rango de valores normales. El valor normal del espesor corneal central en una población sana de raza caucásica fue de 486,81 μm a 609,61 μm (intervalo de confianza del 95%) medida con paquimetría ultrasónica, con lo que dicho valor se encontraría en el límite del espesor corneal central normal.¹⁷⁵ La paquimetría óptica medida central dada por el Orbscan II ^{142,176} sería muy similar cuando se está usando un factor de corrección lineal por defecto, de no usarlo puede ser de 23 a 28 μm mayor que la paquimetría ultrasónica.¹⁷⁷ Los valores encontrados en el grupo del QC subclínico son muy parecidos a los comunicados en otros estudios.^{178,179}

Como hemos comentado, la paquimetría central aislada no es útil en el diagnóstico, debido al amplio rango de normalidad en los ojos sanos y al grado de solapamiento con las córneas anormales o por el porte de LC.¹⁸⁰ Aunque no es lo más frecuente, el QC o sospecha de QC pueden darse en córneas con paquimetría elevada, mientras que córneas con paquimetría en el rango bajo de normalidad pueden ser normales.¹ La comparación entre espesores de diferentes sectores de la córnea, tiene más valor que la paquimetría en una zona concreta, esta idea es la que está siendo evaluada mediante diferentes sistemas de tomografía corneal, con el fin de generar índices que permitan el diagnóstico precoz. Los valores mínimos de paquimetría obtenidos en nuestro estudio, son más altos tanto en el grupo de QC como en el subclínico comparado con otros estudios,¹⁴⁸ aún así, dichos valores siguen siendo cifras significativamente inferiores al grupo control. Otros estudios no demostraron diferencias estadísticas significativas entre sospechas de QC y un grupo control.¹⁴² Tuft et al¹⁶² encontraron en ojos sanos un valor promedio de 550 μm y Auffarth et al¹⁷⁴ cifraron en 457 μm el espesor mínimo en pacientes con QC, coincidiendo con nuestros valores y con otro estudio.¹⁷³

La elevación de la cara posterior se ajusta al rango de normalidad; aunque sean valores significativamente distintos entre los grupos, la elevación máxima no permite inferir la sospecha de QC. Estos valores son similares a los

encontrados por otros autores en pacientes sometidos a ablaciones estromales; Wang et al¹⁸¹ hallaron una elevación de 41µm en córneas con lechos residuales inferiores a 250 µm, y Kamiya et al¹⁸² comunicaron elevaciones de 34 y 54 µm. Sin embargo, otro estudio obtuvo valores inferiores a 40µm,⁵ coincidiendo más con los encontrados en nuestro grupo subclínico.

7.2. TLRs Y LIGANDOS ENDÓGENOS

A pesar de extensos estudios básicos y clínicos de QC en los últimos años, los mecanismos exactos que subyacen a esta patología siguen siendo desconocidos. Como se ha mencionado en capítulos anteriores los componentes fisiopatológicos de QC se pueden clasificar en las siguientes fases: alteraciones de la composición de estroma, el desequilibrio de las moléculas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, el desequilibrio de las enzimas que causan la degradación de la matriz extracelular y sus inhibidores correspondientes, el estrés oxidativo, y hipersensibilidad celular. Estos eventos se producen simultáneamente, pero todavía no está claro cuál precede a cuál, y que eventos son necesarios para la evolución de la enfermedad.¹⁸³ En este sentido, varios estudios clínicos de QC apoyan la idea de que su patogenia implica un componente inmune e inflamatorio.^{112,139,140,183,184}

Los estudios más recientes demuestran que los cambios moleculares asociados a QC pueden tener manifestación sistémica, como se ha demostrado con el mecanismo de estrés oxidativo.^{185,186} En apoyo de esta afirmación, se está acumulando evidencia de que los cambios inflamatorios sistémicos sobre el estrés oxidativo pueden afectar el microambiente de la córnea en QC.¹⁸⁷ En consecuencia, la inflamación sistémica supervisada a través de la relación de neutrófilos a los linfocitos fue asociada recientemente con la progresión de la enfermedad,¹⁸⁵ así como el estrés oxidativo sistémico.¹⁸⁸ El aumento de la frecuencia de los neutrófilos indica condiciones pro-inflamatorias, y los neutrófilos están directamente asociados con la activación de las MMP, que se han encontrado elevadas en QC.^{111,118,184} Estos resultados están en línea con resultados de estudios realizados por nuestro grupo de trabajo, donde mostraron que la proporción de TLR2 y TLR4 expresada en neutrófilos y monocitos, fue significativamente mayor en los pacientes con QC en comparación con sujetos control y que los pacientes con QC también tenían mayores niveles de IL-1B, IL-6, TNF-α, MMP-9 y NF-kB. Además, se encontró una fuerte correlación entre la expresión de TLR2 en monocitos y neutrófilos. También entre los TLR4 en monocitos con los niveles séricos de IL-1, IL-6, TNF-α, MMP-9 y la expresión de NF-kB (sobre las cuales nuestro grupo ya se encuentra en la fase de presentación de resultados de un estudio adicional y pendientes de publicación). Por otra parte, se han demostrado que los marcadores inflamatorios, tales como IL-6, TNF-α, MMP-9 se encuentran significativamente elevados en las lágrimas de los pacientes con QC respecto a controles.^{111,118} También hay una disminución de

los niveles de Lf, IGKC y ZAG en las lágrimas de los pacientes con QC comparación con sujetos controles.¹³⁹ Estos datos sugieren que los procesos inflamatorios e inmunológicos pueden estar involucrados en la patogénesis del QC, aún más cuando estos biomarcadores se asociaron con la gravedad de dicha enfermedad.^{111,139} Por consiguiente, es posible argumentar que tal respuesta inflamatoria podría ser una consecuencia de la activación de TLR. De hecho, estudios previos han demostrado que el tratamiento de células epiteliales de la córnea con la neutralización de anticuerpos TLR2 inducida por una disminución significativa de los niveles de IL-6, IL-8 y TNF- α niveles.^{107,189}

La película lagrimal contiene numerosos componentes inmunes específicos y no específicos, que incluyen citoquinas, moléculas de adhesión celular y varios tipos de células,^{190,191} incluyendo los queratocitos que expresan IL-6 en respuesta a una estimulación por IL-1 β o TNF- α ,¹⁹² sabemos que los TLRs aumentan la secreción de IL-6 y TNF- α en fibroblastos corneales,¹⁹³ por tanto era necesario demostrar que la concentración de TLRs era más elevada en las células epiteliales corneales y/o conjuntivales en pacientes con QC. Este trabajo demuestra una alteración de la inmunidad innata en pacientes con afectación unilateral respecto a sujetos sin enfermedad. Para ello, se analizó la concentración de marcadores inflamatorios en tejido corneal y conjuntival. De los marcadores estudiados, el que presenta mayor capacidad para diferenciar estadísticamente entre un ojo sin patología y el ojo contralateral de un QC unilateral que no presenta signos clínicos es el TLR2 en córnea, dando unos valores de sensibilidad y especificidad muy altos. Este parámetro presenta el área bajo la curva ROC más alta de los parámetros estudiados (TLR2 conjuntiva, TLR4 córnea y conjuntiva), con lo cual es posible inferir niveles anómalos de actividad inmunológica innata en personas con QC altamente asimétrico, tanto en un ojo con signos clínicos como el que no los presenta. Al efectuar la comparación entre el ojo sin signos clínicos y el que sí los manifiesta, el área bajo la curva ROC de este parámetro es menor, como lo son la sensibilidad y especificidad de los valores de corte en UAF que proporciona, por lo que podemos inferir que estos dos grupos de ojos son más similares entre sí, que lo son el contralateral sin signos clínicos y el grupo control. Cuando comparamos los ojos del grupo control con el grupo de pacientes, los valores del área bajo la curva ROC son también muy elevados, como los parámetros de sensibilidad y especificidad, pero recordamos que estos grupos ya se diferencian por la presencia de signos clínicos en los pacientes que, por su propia definición, no pueden ser encontrados en los controles. Ésta es la razón por la cual hemos escogido el ojo contralateral sin signos clínicos de un paciente con QC muy asimétrico como objeto de estudio, con vistas a caracterizar los estadios más iniciales de la patología.

Considerando nuestros resultados, creemos que la determinación de estos marcadores moleculares se convertirá en herramientas para los profesionales sanitarios en el tratamiento de la inflamación de la superficie ocular. Algunos trabajos sugieren que la respuesta inflamatoria causada por la unión de los TLRs a diferentes ligandos podría constituir una clave terapéutica para esta respuesta inmune.¹⁹⁴⁻¹⁹⁶ Sobre la especificidad de este tipo de tratamientos, se sabe que los TLR-4 son más elevados en el estroma de pacientes con queratoconjuntivitis vernal en relación con los tejidos normales, pero no se encontró ninguna diferencia en la inmunorreactividad de TLR-2 entre las conjuntivas sanas y alérgicas.¹⁹⁷

Por último, cabe destacar que no hubo diferencia estadística en los TLR estudiados entre las formas subclínicas y ojos sanos en la conjuntiva. Importante dato ya que como sabemos los TLR están asociados a diferentes enfermedades inflamatorias como la alergia conjuntival.

La Lactoferrina, producida por las glándulas lacrimal principal y accesorias,¹⁹⁸ tiene propiedades anti-inflamatorias y un decrecimiento en sus niveles en lágrima podría aumentar los marcadores inflamatorios presentes en la misma.¹¹⁸ Aunque muchos estudios han examinado los cambios en las córneas del QC, muy pocos han analizado las proteínas de la película lagrimal de estos pacientes. Se sabe que la superficie ocular en el QC se caracteriza por alteraciones en el ciclo de renovación, metaplasia escamosa y reducción en el número de células caliciformes, todos parecen estar relacionados con la extensión de la progresión del QC.¹⁹⁹ Este estudio, de forma pionera, consideramos ha cuantificado los niveles de Lf en las lágrimas de pacientes con QC subclínico correlacionando así, cambios con el grado de afectación o gravedad de la enfermedad. Los estudios de las proteínas de la película lagrimal junto con los cambios de la topografía corneal son esenciales para la comprensión del curso de la enfermedad. Nosotros hemos encontrado una clara disminución de la Lf en los ojos con afectación de la enfermedad, comparada con los sujetos sanos, pero sin mostrar significación estadística con la gravedad o grado de afectación de la enfermedad, coincidiendo con otros trabajos.¹²⁸ Nuestros resultados en grupo control y QC están en concordancia con diferentes estudios similares, son iguales o algo más bajos.^{128,139,200} Otra de las propiedades de la Lf es la captación de iones de hierro que participan en la proliferación de las bacterias locales en la película lagrimal.²⁰¹ El hallazgo de una menor concentración de Lf en córneas con QC de diverso grado sería otro indicativo de que la reducción de dichos niveles de Lf puedan contribuir a la libre deposición de hierro en estas córneas, explicando así el aumento del estrés oxidativo y que en algunos casos más avanzados por la enfermedad, presenten el signo de "anillo de Fleischer".⁶⁴ Algunos autores demuestran que los niveles de Lf no están influenciados por llevar LC o por presentar alergias,²⁰² además han confirmado que dichos niveles de Lf en lágrima son independientes a la edad y al sexo del sujeto,²⁰³ pudiendo

influir sólo a edades superiores a 50 años,²⁰⁴ no afectando estas variables en nuestro estudio. Un estudio demostró una disminución en los niveles de Lf sérica en sujetos con rinitis alérgica.²⁰⁵ La reducción de los niveles de Lf también se han presentado en casos de ojo seco, síndrome de Sjögren,^{206,207} tracoma,²⁰⁸ conjuntivitis vernal, conjuntivitis papilar gigante inducida por lentes de contacto²⁰⁹ y cirugía de catarata postoperatoria.²¹⁰ Sin embargo, el "ojo seco" está asociado con una mayor concentración de albúmina en la lágrima,²¹¹ estas diferencias podrían ser útiles para diferenciar el QC de las condiciones de ojo seco. También se ha descrito una mayor expresión de la albúmina sérica en el QC.²⁰⁰

Otra caracterización de los pacientes con QC, es un engrosamiento de los nervios corneales que resulta en una disminución de la sensibilidad corneal.²¹² Recientemente se ha revisado la regulación neural de la glándula lagrimal. La estimulación de los nervios corneales (y conjuntivales) aferentes y sensitivos activa los nervios eferentes que unen el núcleo cerebral lacrimal con la glándula lagrimal, estimulando así la secreción de electrolitos, agua y proteínas.²¹³ A niveles bajos de estimulación nerviosa sensorial se produce suficiente lágrima para cubrir la superficie ocular como la película lagrimal precorneal. Una estimulación más intensa provoca un aumento del lagrimeo. Nuestros resultados, de disminución de los niveles de Lf en lágrima, coinciden con una publicación que mostró cambios similares tras la queratectomía fotorrefractiva (PRK).²¹⁴ Por lo tanto, es probable que mecanismos similares estén trabajando para reducir la concentración de ciertas proteínas lagrimales, los autores creen que una de las explicaciones más probables son los cambios en los nervios corneales.²¹⁵ La inflamación de la córnea puede modular la secreción de lagrimeo de la glándula lagrimal,²¹⁴ con PRK, los nervios están dañados y se ha demostrado que se produce degeneración de los nervios corneales en el QC.²¹⁵ Los nervios degenerados en las córneas con QC están implicados en el aumento de la expresión de enzimas proteolíticas.²¹⁶ La sobreexpresión de proteasas en córneas y película lagrimal de pacientes con QC han sido revisadas por diversos autores.^{217,218} La córnea en el QC está bajo estrés oxidativo importante;^{218,219} esta falta de acción por parte de la Lf ante dicho estrés oxidativo,²¹¹ incrementaría la expresión de proteasas tales como colagenasas y gelatinasas. Las proteasas podrían tener un papel importante en la reducción de la concentración de proteínas en lágrima observadas en un estudio previo.¹²⁵

La familia de las lactoferrinas es altamente catiónica. Su alta carga superficial positiva es una característica crucial para su capacidad a unirse a células, moléculas de superficie celular y moléculas tales como ADN, glicosaminoglicanos y LPS. A esto podemos añadir ahora la probable importancia de las interacciones a través de las cadenas de glicanos de Lf, que pueden resultar muy importantes para sus actividades antivirales. Por ello, cabe destacar que la Lf puede unirse y secuestrar los LPS, evitando así la activación de la vía

pro-inflamatoria, la sepsis y el daño tisular.²²⁰ Es una proteína de defensa de primera línea implicada en la protección contra una multitud de infecciones microbianas, que atenúa la inflamación sistémica. En este sentido, representa uno de los mecanismos más eficaces activados por la respuesta innata para neutralizar LPS.²²¹ Sin embargo, la interacción entre Lf y LPS es compleja, y puede resultar en diferentes resultados, incluyendo tanto la supresión de la respuesta inflamatoria y la activación inmunológica. Estos hallazgos son de importancia crítica en el desarrollo de intervenciones terapéuticas basadas en Lf en seres humanos. La comprensión de las bases moleculares y las consecuencias funcionales de la interacción Lf-LPS proporcionará ideas para determinar su papel en la salud y la enfermedad. A este respecto, la capacidad de Lf para influir negativa o positivamente en la producción de citoquinas depende, al menos en parte, de su capacidad para unirse y secuestrar tanto el LPS como su receptor CD14, así como el ADN bacteriano CpG, la activación a lo largo de la cascada (*downstream*) de las vías pro-inflamatorias, el choque séptico y el daño tisular.²²² Resumiendo, esta molécula se comporta como una molécula de fármaco mediante la supresión eficaz de la reacción inmune excesiva inducida por endotoxina bacteriana en la sepsis o la promoción, en condiciones particulares, de una respuesta protectora que mantiene al huésped alertado contra la agresión patógena. La acción pleiotrópica de estas moléculas se debe principalmente a su naturaleza fuertemente catiónica que permite su unión a una plétora de moléculas de expresión ubicua en diferentes blancos celulares. Finalmente, no debe asumirse que las propiedades de Lf que dependen de características de superficie serán comunes a las Lfs de todas las especies. Se sabe por estudios que la Lf tiene potencial como un terapéutico eficaz en el control de la infiltración de eosinófilos en condiciones inflamatorias atópicas.²²³

Un resultado inesperado en el análisis de lágrima que realizamos fue la concentración libre de cFn, que juega un papel importante en la cicatrización de las heridas corneales. Ésta no mostró significación estadística entre grupos, pero sí se encuentra algo más elevada en nuestros pacientes, coincidiendo con otros estudios.²²⁴ Sabiendo que se encuentra en la matriz extracelular, ya que sabemos que se libera con la lesión tisular, podremos pensar en la existencia de un posible ligando endógeno. La fibronectina aplicada externamente, promueve la repitelización de la córnea tanto *in vitro* como *in vivo*, y los colirios tópicos de cFn han sido utilizado con éxito para el tratamiento de la córnea con defectos epiteliales persistentes.²²⁵ Asimismo, la fibronectina se ha detectado en lágrima, observándose que sus niveles aumentan después de cirugía de catarata (mínimamente invasiva), en epitelios corneales degradados y tras traumatismos, que inducen un estado de inflamación.²⁰² Sin embargo, los cambios dinámicos de la concentración de cFn en el líquido lagrimal no han sido investigados, y el origen de la cFn en la película lagrimal es todavía desconocido, aunque en los casos de daño superficial ocular, enfermedad, lagrimeo reflejo y dilatación se observan invariablemente vasos sanguíneos conjuntivales. La fibronectina

lagrimal proviene de los vasos conjuntivales, más permeables durante la inflamación, donde es capaz de contribuir a la restauración de la superficie ocular.⁹⁴ Así, los cambios en la concentración o la integridad de la cFn en la película lagrimal pueden ser paralelos a la respuesta inflamatoria.

7.3. ASOCIACIÓN ENTRE TLRs, LIGANDOS ENDÓGENOS, LF Y EVOLUCIÓN DEL QC

Nuestros resultados encuentran unos valores de significación estadística entre los tres parámetros considerados más influyentes con la progresión de la enfermedad (K2, coma y punto de mínimo espesor) y los TLR2 y TLR4 en córnea y conjuntiva, sólo en el valor aberrométrico nos mostró una significancia estadística con la disminución de la Lf en la lágrima de nuestros pacientes, esta disminución era mayor cuanto más elevado era dicho valor, dando a entender, cuanta más progresión hay de la enfermedad. Todos los valores topográficos tanto en el ojo menos afectado, como con el ojo clínico, fueron también significativamente más alto coincidiendo con la mayor expresión de TLR2 y TLR 4 sobre todo en córnea. La expresión de los Toll-like fue superior cuanto mayor era el valor de K2, el coma y cuanto más disminuido era el punto de mínimo espesor, indicándonos que cuanto más avanzada está la enfermedad más altos son los valores de los marcadores inflamatorios. Como se ha comentado anteriormente estos valores son los más destacados para empezar a distinguir los ojos normales de los patológicos y por lo tanto también son los que habrá que tener en cuenta en un futuro para observar los cambios con el tiempo junto con los receptores Toll-like.

Ahora bien, la presencia de valores elevados de TLR2 en córnea con QC, no es indicativa del tiempo diagnosticado, ya que estadísticamente si da una diferencia entre los valores normales y los anormales, pero la distribución de TLR2 en córnea a lo largo de la enfermedad no es significativa. Aumentó durante los primeros años (coincidiendo con el pico de auge de la enfermedad), alcanzando su máxima entre los 6 y 16 años, con una caída en los siguientes años. Esto podría explicar, porque en estudios sobre la evolución del QC, disminuye la probabilidad de progresión de la enfermedad a partir de los 16 años.^{54,145} Por tanto, nuestros resultados no confirman o desmienten la duración del QC o tiempo de diagnóstico, aún no están muy claros, pero si nos puede confirmar grados de normalidad y afectación.

7.4. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

No realizar una segunda toma de muestra a los mismo sujetos sanos y pacientes y así poder comparar los resultados obtenidos con el paso del tiempo. Creemos que los estudios a largo plazo de la superficie ocular en los mismos pacientes hasta e incluso después de la prescripción de lentes de contacto o un procedimiento de queratoplastia penetrante, proporcionarían información importante sobre el curso natural de la enfermedad de la superficie ocular del

QC. Una investigación sobre los cambios de los patrones topográficos en el tiempo y su correlación con la gravedad de la enfermedad de la superficie ocular también sería muy interesante. Tratamos de llevar a la luz una parte poco estudiada hasta la fecha de la enfermedad, valoramos las similitudes y diferencias con otra patología de superficie ocular como el "ojo seco". Por lo tanto, estamos firmemente convencidos de que se debe iniciar y seguir trabajando en este sentido.

7.5. PERSPECTIVAS FUTURAS

El interés en la detección de la forma frustré o subclínica ha impulsado el desarrollo de índices cuantitativos y programas de diagnóstico basados en la topografía corneal, a pesar de lo cual el diagnóstico de la forma frustré de QC sigue constituyendo un desafío.¹² La elevación corneal posterior, la histéresis corneal, el factor de resistencia a la córnea y el coma vertical, podrían detectarse mediante topografía en elevación, biomecánica y sensor de frente de onda. Sin embargo, ninguno de estos cambios sutiles presenta suficiente sensibilidad o especificidad para ser utilizado por sí mismo para hacer un diagnóstico.

Los receptores Toll-like (TLRs) son estructuras moleculares expresadas de forma ubicua en toda la extensión de la superficie ocular. Podemos encontrar a los TLR2 y TLR4 tanto en el epitelio conjuntival, como en el limbal, como en la corneal.^{226,227} Juegan un papel muy importante en la detección de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y ligandos endógenos, activando la respuesta inmune innata que lleva a la producción de células inflamatorias como citoquinas y quimioquinas. La acción de los TLRs puede contribuir a la exacerbación de varias condiciones inflamatorias de la superficie ocular tales como alergias¹⁹⁹ y "ojo seco".²²⁸ Tal vez merezca la pena probar futuras investigaciones que arrojasen más información sobre los receptores Toll-like, que muestran un exceso de expresión de actividad que lleva a la degradación de tejido. Estudios en las diferentes formas de QC, y un estudio de las demás ectasias corneales, aunque demuestren un componente inflamatorio de diferente naturaleza. Así se podrían esclarecer aspectos desconocidos del QC en sus estadios iniciales que nos sirva para comparar con el QC. Supondría un nuevo avance en el diagnóstico de las formas más sutiles preclínicas de ectasia.

El aspecto positivo de los TLR podría residir, en que desempeñen un rol inmunomodulador precoz que se active en fases tempranas de la enfermedad, a través del bloqueo de ligandos endógenos o mediante la activación de anticuerpos neutralizantes. Los resultados de nuestro estudio permitirán encaminar futuras investigaciones para la búsqueda de agonistas de receptores TLR2 y TLR4 en córnea, capaces de abolir el efecto del compuesto, sin alterar la homeostasis de la superficie ocular. Asimismo, sería interesante que el efecto modulador de dichos receptores persistiese en el tiempo. Esto último es

importante en el caso de las formas iniciales de la enfermedad, ya que nos permitiría proponer un plan terapéutico. La Lf es una molécula versátil conservada en diversa expresión a través de las especies de mamíferos, que actúa para defender su superficie mucosa y conjuntival de la agresión externa, como ya hemos mencionado. Su capacidad para ejercer un doble papel en la regulación de la respuesta inmune ya sea por supresión de la inflamación o inducción de la inmunidad activa, hace de esta molécula un candidato prometedor en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en patologías como el QC, sin efectos secundarios para combatir los trastornos inmunodeficientes.

Por todo ello proponemos la posibilidad de que los TLRs serían un buen candidato como dianas terapéuticas en la ectasia corneal, mediante su inmunomodulación por bloqueo con anticuerpos neutralizantes (anti-TLR2 o anti-TLR4), el bloqueo de sus ligandos endógenos (cFn y Lf), o se podría desarrollar un marcador que permita seleccionar ojos asintomáticos (subclínicos) propensos a desarrollar un QC clínico, o bien, pacientes con QCs leves que van a progresar a QCs graves.

Finalmente, sería deseable confirmar un marcador que determinase el riesgo que la enfermedad progrese, identificando los casos autolimitados en los que la ectasia corneal se pudiese tratar mediante rehabilitación visual no quirúrgica. Para poner la primera piedra en este objetivo, el diagnóstico de las *formas frustre* dejaría de ser topográfico para pasar a ser biomecánico, bioquímico o molecular. Dentro de la tarea de caracterización exhaustiva del QC subclínico, señalar el desarrollo reciente de instrumentos que proporcionan mediciones de la capacidad de deformación de la córnea ante una fuerza externa (histéresis). Estos instrumentos (ORA, Corvis ST) se han empezado a utilizar como complemento a los procedimientos establecidos para determinar la aptitud de un candidato a cirugía refractiva, obteniendo medidas sobre la respuesta dinámica de la córnea (y a través de ella, del conjunto del globo ocular como elemento sujeto a fuerzas estructurales).²²⁹ Éstos podrían servir como indicadores precoces de una córnea cuya resistencia estructural pudiera no ser la idónea para realizar intervenciones de sustracción de tejido que pudieran comprometer su integridad a largo plazo. Sin olvidar futuras investigaciones sobre la morfología de los nervios corneales y los plexos que forman, las enzimas proteolíticas de lágrimas son esenciales para dilucidar la disminución de los niveles de proteínas apreciados en el QC.

I) INTRODUCCIÓN

II) JUSTIFICACIÓN

III) HIPÓTESIS

IV) OBJETIVOS

V) MATERIAL Y MÉTODO

VI) RESULTADOS

VII) DISCUSIÓN

VIII) CONCLUSIONES

IX) REFERENCIAS

X) ANEXOS



CONCLUSIONES

- 1. La expresión de TLR2 y TLR4 en células del epitelio corneal y conjuntival es mayor en ojos con queratocono que en subclínicos y controles.**
- 2. La expresión de TLR2 y TLR4 en células del epitelio corneal y conjuntival en pacientes con queratocono unilateral se asocia con la progresión del queratocono, evaluada por parámetros topográficos como K2, coma y punto de mínimo espesor.**
- 3. La expresión de TLR2 y TLR4 en células del epitelio corneal predice con una alta sensibilidad y especificidad el riesgo de inicio y progresión del queratocono.**
- 4. Los niveles de lactoferrina en lágrima están significativamente disminuidos en el ojo con queratocono y subclínico con respecto al ojo control.**
- 5. Existe una correlación negativa entre los niveles de lactoferrina en lágrima y la expresión de TLR2 en células epitelilales corneales y conjuntivales, sugiriendo su función inmunomoduladora.**
- 6. Existe una correlación positiva entre los niveles de fibronectina celular en lágrima y la expresión de TLR2 en epitelio corneal y conjuntival, sugiriendo su función como ligando endógeno.**
- 7. TLR2 y TLR4 son potenciales biomarcadores para predecir el riesgo de aparición o progresión del QC.**



I) INTRODUCCIÓN

II) JUSTIFICACIÓN

III) HIPÓTESIS

IV) OBJETIVOS

V) MATERIAL Y MÉTODO

VI) RESULTADOS

VII) DISCUSIÓN

VIII) CONCLUSIONES

IX) REFERENCIAS

X) ANEXOS



1. Feder RS. Noninflammatory ectatic disorders. En: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, (eds). *Cornea and external disease: clinical diagnosis and management*. St Louis: Mosby. 1997; 1091-1106.
2. Binder PS, Lindstrom RL, Stulting RD, Donnenfeld E, Wu H, McDonnell P, Rabinowitz YS. Keratoconus and corneal ectasia after LASIK. *J Cataract Refract Surg*. 2005; 31: 2035-2038.
3. Sonoda S, Uchino E, Nakao K, Sakamoto T. Inflammatory cytokine of basal and reflex tears analysed by multicytokine assay. *Br J Ophthalmol*. 2006; 90: 120-122.
4. Dobbins KR, Price FW, Whitson WE. Trends in the indications for penetrating keratoplasty in the midwestern United States. *Cornea*. 2000; 19: 813-816.
5. Wei R, Zhao S, Lim L, Tan DT. Incidence and characteristics of unilateral keratoconus classified on corneal topography. *J Refract Surg*. 2011; 10: 1-7.
6. Kennedy RH, Bourne WM, Dyer JA. A 48-year clinical and epidemiologic study of keratoconus. *Am J Ophthalmol*. 1986; 101: 267-273.
7. Nesburn AB, Bahri S, Salz J, Rabinowitz YS, Maguen E, Hofbauer J, Berlin M, Macy JI. Keratoconus detected by videokeratography in candidates for photorefractive keratectomy. *J Refract Surg*. 1995; 11: 194-201.
8. Rabinowitz YS. Videokeratographic indices to aid in screening for keratoconus. *J Refract Surg*. 1995; 11: 371-379.
9. Jafri B, Xiaohui L, Yang H, Rabinowitz YS. Higher order wavefront aberrations and topography in early and suspected keratoconus. *J Refract Surg*. 2007; 23: 774-781.
10. Butler TH. *An illustrated guide to the slit lamp*. London: Oxford University Press. 1927; 39.
11. Lebow KA, Grohe RM. Differentiating contact lens induced warpage from true keratoconus using corneal topography. *CLAO J*. 1999; 25:114-122.
12. Sonmez B, Doan MP, Hamilton DR. Identification of scanning slit-beam topographic parameters important in distinguishing normal from keratoconic corneal morphologic features. *Am J Ophthalmol*. 2007; 143: 401-408.
13. Waring GO, III. Nomenclature for keratoconus suspects. *Refractive & Corneal Surgery*. 1993; 9: 219-222.
14. De Rojas V. Clasificación del queratocono. En: Albertazzi R. *Queratocono: pautas para su diagnóstico y tratamiento*. Buenos Aires: Ediciones científicas Argentinas para la Keratoconus Society. 2010; 33-97.
15. Wilson S, Lin D, Klyce S. Corneal topography of keratoconus. *Cornea*. 1991; 10: 2-8.
16. Li X, Yang H, Rabinowitz YS. Longitudinal study of keratoconus progression. *Exp Eye Res*. 2007; 85: 502-507.

17. Rabinowitz YS. Ectatic disorders of the cornea. *The cornea. Scientific Foundations and Clinical Practice*" (Editores: CS Foster, DT Azar, CH Dohlman). Lippincott, Williams and Wilkins. Philadelphia. 2005; 889-911.
18. Zadnik K, Barr JT, Edrington TB, Everett DF, Jameson M, McMahon TT, Shin JA, Sterling JL, Wagner H, Gordon MO. Baseline findings in the Collaborative Longitudinal Evolution of Keratoconus (CLEK) Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998; 39: 2537-2546.
19. Karimian F, Aramesh S, Rabei HM, Javadi MA, Rafati N. Topographic evaluation of relatives of patients with keratoconus. *Cornea.* 2008; 27: 874-878.
20. Wang Y, Rabinowitz YS, Rotter JL, Yang H. Genetic epidemiological study of keratoconus: evidence for major gene determination. *Am J Med Genet.* 2000; 93: 403-409.
21. Barreto J, Netto MV, Santo RM, José NK, Bechara SJ. Slit-scanning topography in vernal keratoconjunctivitis. *Am J Ophthalmol.* 2007; 143: 250-254.
22. Bawazeer AM, Hodge WG, Lorimer B. Atopy and keratoconus: a multivariate analysis. *Br J Ophthalmol.* 2000; 84: 834-836.
23. Rabinowitz YS, Dong L, Wistow G. Gene expression profile studies of human keratoconus cornea for NEI-Bank : a novel cornea –expressed gene and the absence of transcripts for aquaporin 5. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005; 46: 1239-1246.
24. Mc Monnies CW, Boneham GC. Keratoconus, allergy, itch, eye-rubbing and hand-dominance. *Clin Exp Optom.* 2003; 86: 376-384.
25. Gasset AR, Houde WI, García-Bengochea H. Contact lens wear as an environmental risk factor for keratoconus. *Am J Ophthalmol.* 1978; 85: 339-341.
26. Mc Monnies CW. The biomechanics of keratoconus and rigid contact lenses. *Eye Contact Lens.* 2005; 31: 80-92.
27. Villa C, Santodomingo J. La cornea: (Parte I) Estructura, función y anatomía microscópica. *Gaceta Optica.* 2010; 454: 14-18.
28. Krachmer J, Feder R, Belin M. Keratoconus and related noninflammatory corneal thinning disorders. *Surv Ophthalmol.* 1984; 28: 293-322.
29. Illahi W. Keratoconus: Diagnosis, contact lens fitting and management. *Optometry Today.* 2006; 18: 27-34.
30. Rabinowitz YS. Keratoconus. *Surv Ophthalmol.* 1998; 42: 297-319.
31. Barraquer RI, De Toledo MC, Torres E. Distrofias y degeneraciones corneales. Barcelona: Espax Publicaciones Médicas. 2004; 269-352.
32. Peris C, Menezo JL, Navea A. Concepto de ectasia. Clasificación. En: Peris C, Menezo JL, (eds). *Tratamiento de la ectasia corneal.* Madrid: Sociedad española de oftalmología. 2007; 13-34.
33. Rabinowitz YS, McDonnell PJ. Computer-assisted corneal topography in keratoconus. *Refract Corneal Surg.* 1989; 5: 400-406.

34. Rabinowitz YS, Rasheed K. A quantitative videokeratography algorithm embodying minimal topographic criteria for diagnosing keratoconus. *J Cataract Refrac Surg.* 1999; 25: 1327-1335.
35. Maeda N, Klyce SD, Smolek MK, Thompson HW. Automated keratoconus screening with corneal topography analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994; 35: 2749-2757.
36. Lovisolo CF, Calossi A, Ottone AC. Intrastromal insert in Keratoconus and ectatic corneal conditions. En: Lovisolo CF, Fleming JF, Pesando PM (eds.). *Intrastromal corneal ring segments.* Canelli, Italia: Fabbiano Editore. 2000; 95-163.
37. Rabinowitz YS, Garbus J, MC Donnell PJ. Computer-assisted corneal topography in family members of patients with keratoconus. *Arch Ophthalmol.* 1990; 108: 365-371.
38. Rabinowitz YS. The genetics of keratoconus. *Ophthalmol Clin North Am.* 2003; 16: 607-620.
39. Abad JC, Rubinfeld RS, Del Valle M, Belin MW, Kurstin JM. Vertical D: a novel topographic pattern in some keratoconus suspects. *Ophthalmology.* 2007; 114: 1020-1026.
40. Lass JH, Lembach RG, Park SB, Hom DL, Fritz ME, Svilar GM, Nuamah IF, Reinhart WJ, Stocker EG, Keates RH. Clinical management of keratoconus. *Ophthalmology.* 1990; 97: 443-445.
41. Galindo A, Galindo J, Sánchez H, Palencia J. Adaptación de lentes de contacto en 133 ojos con astigmatismo irregular. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2007; 82: 747-752.
42. Thomas D. Contact lens fitting today: fitting for the irregular cornea. *Optometry Today.* 2005; 21: 32-39.
43. Jhanji V, Sharma N, Vajpayee R. Management of keratoconus: current scenario. *Br J Ophthalmol.* 2011; 95: 1044-1050.
44. Tomalla M, Wea C. Modern treatment options for the therapy of keratoconus. *Cont Lens Anterior Eye.* 2007; 30: 61-66.
45. Siganos CS, Kymionis GD, Kartakis N, Theodorakis MA, Astyrakakis N, Pallikaris IG. Management of keratoconus with intacs. *American Journal of Ophthalmology.* 2003; 135: 64-70.
46. Hayes S, Boote C, Kamma-Lorger CS, Rajan MS, Harris J, Dooley E, Hawksworth N, Hiller J, Terill NJ, Hafezi F, Brahma AK, Quantock AJ, Meek KM. Riboflavin/UVA collagen cross-linking induced changes in normal and keratoconus corneal stroma. *PLoS One.* 2011; 6: 1-6.
47. Levy D, Hutchings H, Rouland JF, Guell J, Burillon C, Arné JL, Colin J, Laroche L, Montard M, Delbosc B, Aptel I, Ginisty H, Grandjean H, Malecaze F. Videokeratographic anomalies in familial keratoconus. *Ophthalmology.* 2004; 111: 867-874.
48. Maguire L, Lowry J. Identifying progression of subclinical keratoconus by serial topography analysis. *Am J Ophthalmol.* 1991; 112: 41-45.

49. Bühren J, Kühne C, Kohnen T. Defining subclinical keratoconus using corneal first surface higher-order aberrations. *Am J Ophthalmol.* 2007; 143: 381-389.
50. Lema I, Suárez AI, Díez-Feijoo E. Unilateral keratoconus: videokeratography and Orbscan study--optical correction. *Eye Contact Lens.* 2009; 35: 15-19.
51. Smolek MK, Klyce SD. Current Keratoconus detection methods compared with a neural network approach. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997; 38: 2290-2299.
52. Amsler M. Keratocone classique et keratocono fruste, arguments unitaires. *Ophthalmologica.* 1946; 111: 96-101.
53. Rabinowitz YS, Nesburn A, McDonnell P. Videokeratography of the fellow eye in unilateral keratoconus. *Ophthalmology.* 1993; 100: 181-186.
54. Holland DR, Maeda N, Hannush SB, Riveroll LH, Green MT, Klyce SD, Wilson SE. Unilateral keratoconus: incidence and quantitative topographic analysis. *Ophthalmology.* 1997; 104: 1409-1413.
55. Saragoussi JJ, Pouliquen YJ. Does the progressive increasing effect of radial Keratectomy (hyperopic shift) correlate with undetected early Keratoconus? *J Refract Corneal Surg.* 1994; 10:45-48.
56. Rabinowitz YS, Yang H, Akkina J, Riley C, Rotter JI, Elashoff J. Videokeratography of normal human corneas. *Br J Ophthalmol.* 1996; 80: 610-616.
57. Pflugfelder SC, Liu Z, Feuer W, Verm A. Corneal thickness indices discriminate between keratoconus and contact lens-induced corneal thinning. *Ophthalmology.* 2002; 109: 2336-2341.
58. Belin MW, Khachikian SS. Keratoconus: it is hard to define, but...*Am J Ophthalmol.* 2007; 143: 500-503.
59. Lee BW, Jurkunas UV, Harissi-Dagher M, Poothullil AM, Tobaigy FM, Azar DT. Ectatic disorders associated with a claw-shaped pattern on corneal topography. *Am J Ophthalmol.* 2007; 144: 154-156.
60. Lim L, Wei RH, Chan WK, Tan DTH. Evaluation of keratoconus in Asians: role of Orbscan II and Tomey TMS-2 corneal topography. *Am J Ophthalmol.* 2007; 143: 390-400.
61. McMahon TT, Szczotka-Flynn L, Barr JT, Anderson RJ, Slaughter ME, Lass JH, Iyengar SK, CLEK Study Group. A new method for grading the severity of keratoconus: the Keratoconus Severity Score (KSS). *Cornea.* 2006; 25: 794-800.
62. Foster CS, Yamamoto GK. Ocular rigidity in keratoconus. *Am J Ophthalmol.* 1978; 86: 802-806.
63. Andreassen TT, Simonsen AH, Oxlund H. Biomechanical properties of keratoconus and normal corneas. *Exp Eye Res.* 1980; 31: 435-441.
64. Chi HH, Katzin HM, Teng CC. Histopathology of keratoconus. *Am J Ophthalmol.* 1956; 42: 847-860.

65. Scroggs MW, Proia AD. Histopathological variation in keratoconus. *Cornea*. 1992; 11: 553-559.
66. Iwamoto T, DeVoe AG. Electron microscopical study of the Fleisher ring. *Arch Ophthalmol*. 1976; 94: 1579-1584.
67. Perry HD, Buxton JN, Fine BS. Round and oval cones in keratoconus. *Ophthalmology*. 1980; 87: 905-909.
68. Critchfield JW, Calandra AJ, Nesburn AB, Kenney MC. Keratoconus. I. Biochemical studies of normal and keratoconus corneas. *Exp Eye Res*. 1988; 46: 953-963.
69. Fullwood NJ, Tuft SJ, Malik NS, Meek KM, Ridgway AE, Harrison RJ. Synchrotron x-ray diffraction studies of keratoconus corneal stroma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1992; 33: 1734-1741.
70. Erie JC, Patel SV, McLaren JW, Nau CB, Hodge DO, Bourne WN. Keratocyte density in keratoconus: a confocal microscopy study. *Am J Ophthalmol*. 2002; 134: 689-695.
71. Kim WJ, Rabinowitz YS, Meisler DM, Wilson SE. Keratocyte apoptosis associated with keratoconus. *Exp Eye Res*. 1999; 69: 475-481.
72. Saghizadeh M, Chwa M, Aoki A, Lin B, Pirouzmanesh A, Brown DJ, Ljubimov AV, Kenney MC. Altered expression of growth factors and cytokines in keratoconus, bullous keratopathy and diabetic human corneas. *Exp Eye Res*. 2001; 73: 179-189.
73. Collier SA. Is the corneal degradation in keratoconus caused by matrix-metalloproteinases? *Clin Exp Ophthalmol*. 2001; 29: 340-344.
74. Somodi S, Hahnel C, Slowik C, Richter A, Weiss DG, Guthoff R. Confocal in vivo microscopy and confocal laser scanning fluorescence microscopy in keratoconus. *German J Ophthalmol*. 1997; 5: 518-525.
75. Ucakhan OO, Kanpolat A, Yilmaz N, Ozkan M. In vivo confocal microscopy findings in keratoconus. *Eye Contact Lens*. 2006; 32: 183-191.
76. Efron N, Hollingsworth. New perspectives on keratoconus as revealed by corneal confocal microscopy. *Clin Exp Optom*. 2008; 9: 34-55.
77. Alió JL, García Ch. Capítulo 1 – Fisiopatología En: *Inflamaciones oculares*. (Alió JL, Carreras B, Ruíz JM, Eds.). Edika Med. Barcelona. 1995; 3-44.
78. Abdelsadik A, Trad A. Toll-like receptors on the fork roads between innate and adaptive immunity. *Hum Immunol*. 2011; 72: 1188-1193.
79. Mayumi U, Shigeru K. Innate immunity of the ocular surface. *Brain Research Bulletin*. 2010; 81: 219-228.
80. Nemet AY, Vinker S, Bahar I, Kaiserman I. The association of keratoconus with immune disorders. *Cornea*. 2010; 29 : 1261-1264.
81. Ferguson TA. FAS-ligand and immune privilege: the eye have it. *Cell Death Differ*. 2001; 7: 771-772.
82. Green DR, Ferguson TA. The role of FAS ligand in immune privilege. *Nat Rev Moll Cell Biol*. 2001; 12: 917-924.

83. Griffith TS, Ferguson TA. The role of FAS l-induced apoptosis in immune privilege. *Immunol Today*. 1997; 18: 240-244.
84. Dana RM, Gian Y, Hamrah P. Twenty-five year panorama of corneal immunology. *Cornea*. 2000; 19: 625-643.
85. Cavaillon JM, Haeflner-Cavaillon N. Cytokines and inflammation. *Rev Prat*. 1993; 43: 547-552.
86. Matsubara M, Girard MT, Kublin CL, Cintron C, Fini ME. Differential role for two gelatinolytic enzymes of the matrix metalloproteinase family in the remodeling cornea. *Dev Biol*. 1991; 147: 425-439.
87. Li DQ, Lokeshwar BL, Solomon A, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC. Regulation of MMP-9 production by human corneal epithelial cells. *Exp Eye Res*. 2001; 73: 449-459.
88. Nishida T, Nakamura M, Mishima H, Otori T. Interleukin 6 promotes epithelial migration by a fibronectin-dependent mechanism. *J Cell Physiol*. 1992; 153: 1- 5.
89. Nakamura M, Nishida T. Differential effects of epidermal growth factor and interleukin 6 on corneal epithelial cells and vascular endothelial cells. *Cornea*. 1999; 18: 452-458.
90. Mosier DE, Subbarao B. Thymus independent antigens: complexity of B lymphocyte activation revealed. *Immunol Today*. 1982; 3: 217-222.
91. Roitt I. *Inmunología. Fundamentos*. 11th edición. Editorial JIMS. Barcelona. 2008.
92. Sobrin L, Liu Z, Monroy DC, Solomon A, Selzer MG, Lokeshwar BL, Pflugfelder SC. Regulation of MMP-9 activity in human tear fluid and corneal epithelial culture supernatant. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000; 41: 1703-1709.
93. Li DQ, Shang TY, kim HS, Solomon A, Lokeshwar BL, Pflugfelder SC. Regulated expression of collagenases MMP-1, -8, and -13 and stromelysins MMP-3, -10, and -11 by human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003; 44: 2928-2936.
94. Fukuda M, Fullard RJ, Willcox MD, Baleriola-Lucas C, Bestawros F, Sweeney D, Holden BA. Fibronectin in the tear film. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996; 37: 459-467.
95. Akpek EK, Gottsch JD. Immune defense at the ocular surface. *Eye*. 2003; 17: 949-956.
96. Pearlman E, Johnson A, Adhikary G, Sun Y, Chinnery HR, Fox T, Kester M, McMenamin PG. Toll-like receptors at the ocular surface. *Ocul Surf*. 2008; 6: 108-116.
97. Makino T, Uozumi K, Shimazaki T, Otsuka M, Kuwazuru Y, Saito T, Utsunomiya A, Hanada S, Hashimoto S. Combination chemotherapy of adult T-cell leukemia (ATL) using cyclophosphamide, vindesine and prednisolone. *Nihon Gan Chiryo Gakkai Shi*. 1988; 23: 2657-2662.

98. Weissmann G. Pattern recognition and gestalt psychology: the day Nüsslein-Volhard shouted "Toll!". *FASEB J.* 2010; 24: 2137-2141.
99. Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell.* 1997; 91: 295-298.
100. Takeuchi O, Akira S. Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int Immunopharmacol.* 2001; 1: 625-635.
101. Lee SJ, Lee S. Toll-like receptors and inflammation in the CNS. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2002; 1: 181-191.
102. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2001; 1: 135-145.
103. Takeda K, Akira S. Regulation of innate immune responses by Toll-like receptors. *Jpn J Infect Dis.* 2001; 54: 209-219.
104. Fukao T, Koyasu S. PI3K and negative regulation of TLR signaling. *Trends Immunol.* 2003; 24: 358-363.
105. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4: 499-511.
106. Ueta M, Kinoshita S. Ocular surface inflammation is regulated by innate immunity. *Prog Ret Eye Res.* 2012; 31: 551-575.
107. Lambiase A, Micera A, Sacchetti M, Mantelli F, Bonini S. Toll-like receptors in ocular surface diseases: overview and new findings. *Clin Sci (Lond).* 2011; 120: 441-450.
108. Flanagan JL, Willcox MD. Role of lactoferrin in the tear film. *Biochimie.* 2009; 91: 35-43.
109. Akhtar S, Bron AJ, Salvi SM, Hawksworth NR, Tuft SJ, Meek KM. Ultrastructural analysis of collagen fibrils and proteoglycans in keratoconus. *Acta Ophthalmol.* 2008; 86: 764-772.
110. Kenney MC, Brown DJ, Rajeev B. Everett Kinsey lecture: The elusive causes of keratoconus: a working hypothesis. *CLAO J.* 2000; 26: 10-13.
111. Lema I, Durán JA. Inflammatory molecules in the tears of patients with keratoconus. *Ophthalmology.* 2005; 112: 654-659.
112. Lema I, Durán JA, Ruiz C, Díez-Feijoo E, Acera A, Merayo J. Inflammatory response to contact lenses in patients with keratoconus compared with myopic patients. *Cornea.* 2008; 27: 758-763.
113. Kaldaway RM, Wagner J, Ching S, Seigel GM. Evidence of apoptotic cell death in Keratoconus. *Cornea.* 2002; 21: 206-209.
114. Balasubramanian SA, Mohan S, Pye DC, Willcox MD. Proteases, proteolysis and inflammatory molecules in the tears of people with keratoconus. *Acta Ophthalmol.* 2012; 90: 303-309.
115. Kenney MC, Nesburn AB, Burgeson RE, Butkowski RJ, Ljubimov AV. Abnormalities of the extracellular matrix in keratoconus corneas. *Cornea.* 1997; 16: 345-351.
116. Smith VA, Easty DL. Matrix metalloproteinase-2. Involvement in keratoconus. *Eur J Ophthalmol.* 2000; 10: 215-226.

117. Smith VA, Matthews FJ, Majid MA, Cook SD. Keratoconus: matrix metalloproteinase-2 activation and TIMP modulation. *Biochim biophys Acta*. 2006; 1762: 431-439.
118. Lema I, Sobrino T, Durán JA, Brea D, Díez-Feijoo E. Subclinical keratoconus and inflammatory molecules from tears. *Br J Ophthalmol*. 2009; 93: 820-824.
119. Meqhpapa B, Nakamura H, Macsai M, Sugar J, Hidayat A, Yue BY, Edward DP. Keratectasia after laser in situ Keratomileusis: a histopathologic and immunohistochemical study. *Arch Ophthalmol*. 2008; 126: 1655-1663.
120. Buddi R, Lin B, Atilano SR, Zorapapel NC, Kenney MC, Brown DJ. Evidence of oxidative stress in human corneal diseases. *J Histochem Cytochem*. 2002; 50: 341-351.
121. Brown DJ, Lin B, Chwa M, Zorapapel NC, Kenney MC, Brown DJ. Elements of the nitric oxide pathway can degrade TIMP-1 and increase gelatinase activity. *Mol Vis*. 2004; 10: 281-288.
122. Chwa M, Atilano SR, Hertzog D, Zheng H, Langberg J, Kim DW, Kenney MC. Hypersensitivity response to oxidative stress in Keratoconus corneal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008; 49: 4361-4369.
123. Shoham A, Hadziahmetovic M, Dunaief JL, Mydlarski MB, Schipper HM. Oxidative stress in diseases of the human cornea. *Free Rad Med Biol*. 2008; 45: 1047-1055.
124. Loh A, Hadziahmetovic M, Dunaief JL. Iron homeostasis and eye disease. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 7: 637-649.
125. Matthews FJ, Cook SD, Masid MA, Majid MA, Dick AD, Smith VA. Changes in the balance of the tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMPs)-1 and-3 may promote keratocyte apoptosis in keratoconus. *Exp Eye Res*. 2007; 84: 1125-1134.
126. Ku JY, Niederer RL, Patel DV, Sherwin T, McGhee CN. Laser scanning in vivo confocal analysis of keratocyte density in keratoconus. *Ophthalmology*. 2008; 115: 845-850.
127. Sykakis E, Carley F, Irion L, Denton J, Hillarby MC. An in depth analysis of histopathological characteristics found in keratoconus. *Pathology*. 2012; 44: 234-239
128. Balasubramanian SA, Pye DC, Wilcox MD. Levels of lactoferrin, secretory IgA and serum albumin in the tear film of people with keratoconus. *Exp Eye Res*. 2012; 96: 132-137.
129. Udar N, Atilano SR, Brown DJ, Holguin B, Small K, Nesburn AB, Kenney MC. SOD1: A candidate gene for keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006; 47: 3345-3351.
130. Zhou L, Sawaguchi S, Twining SS, Sugar J, Feder RS, Yue BY. Expression of degradative enzymes and protease inhibitors in corneas with keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998; 39: 1117-1124.

131. Collier SA, Madigan MC, Penfold PL. Expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and MMP-2 in normal and keratoconus corneas. *Curr Eye Res.* 2000; 21: 662-668.
132. Maruyama Y, Wang X, Li Y, Sugar J, Yue BY. Involvement of Sp1 elements in the promoter activity of genes affected in Keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 42: 1980-1985.
133. Cheung I, McGhee C, Sherwin T. A new perspective on the pathobiology of keratoconus : interplay of stromalwound healing and reactive species-associated processes. *Clin Exp Optom.* 2013; 96: 188-196.
134. Fabre EJ, Bureau J, Pouliquen Y, Lorans G. Binding sites for human interleukin 1 alpha, gamma interferón and tumor necrosis factor on cultured fibroblasts of normal cornea and keratoconus. *Curr Eye Res.* 1991; 10: 585-592.
135. Wilson SE, Liu JJ, Mohan RR. Stromal- epithelial interactions in the cornea. *Prog Retin Eye Res.* 1999; 18: 293-309.
136. Finnin MS, Donigian JR, Cohen A. Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature.* 1999; 401: 188-193.
137. Nielsen K, Vorum H, Fagerholm P, Birkenkamp-Demtröder K, Honoré B, Ehlers N, Orntoft TF. Proteome profiling of corneal epithelium and identification of marker proteins for keratoconus, a pilot study. *Exp Eye Res.* 2006; 82: 201-209.
138. McGeady SJ. Immunocompetence and allergy. *Pediatrics* 2004;113; 1107-1113.
139. Lema I, Brea D, Rodríguez-González R, Díez-Feijoo E, Sobrino T. Proteomic analysis of the tear film in patients with keratoconus. *Mol Vis.* 2010; 16: 2055-2061.
140. Lambiase A, Merlo D, Mollinari C, Bonini P, Rinaldi AM, D' Amato M, Micera A, Coassin M, Rama P, Bonini S, Garaci E. Molecular basis for keratoconus: lack of TrkA expression and its transcriptional repression by Sp3. *Pro Natl Acad Sci USA.* 2005; 102: 16795-16800.
141. Alió JL, Shabayek MH. Corneal Higher Order Aberrations: A Method to Grade Keratoconus. *Journal of Refractive Surgery.* 2006; 22: 539-545.
142. Rao SN, Raviv T, Majmudar PA, Epteinsh RJ. Role of Orbscan II in screening keratoconus suspects before refractive corneal surgery. *Ophthalmology.* 2002; 109: 1642-1646.
143. Maguire LJ, Bourne WM. Corneal topography of early keratoconus. *Am J Ophthalmol.* 1989; 108: 107-112.
144. Shirayama-Suzuki M, Amano S, Honda N, Yamagami S, Oshika T. Longitudinal analysis of corneal topography in suspected Keratoconus. *Br J Ophthalmol.* 2009; 93: 815-819.

145. Léoni-Mesplíé S, Mortemousque B, Touboul D, Malet F, Praud D, Mesplíé N, Colin J. Scalability and severity of keratoconus in children. *Am J Ophthalmol*. 2012; 154: 56-62.
146. Hammerstein W. Die bedeutung des geschlechtsverhältnisses für die ermittlung des x-chromosomalen erb ganges, dargestellt am krankheitsbild des keratoconus. *Klin Monatsbl Augenheilkd*. 1971; 190: 293-308.
147. Xiaohui LI, Rabinowitz YS, Rasheed K. Longitudinal study of the Normal Eyes in Unilateral Keratoconus Patients. *Ophthalmology*. 2004; 111: 440-446.
148. Arntz A, Duran JA, Pijoan JI. Diagnóstico del queratocono subclínico por topografía de elevación. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2003; 78: 659-664.
149. Eggink FA, Pinckers AJ, Van Puyenbroed EP. Keratoconus, a retrospective study. *Contact Lens J*. 1988; 16: 204-206.
150. Tuft SJ, Moodaley LC, Gregory WM, Davison CR, Buckley RJ. Prognostic factors for the progression of keratoconus. *Ophthalmology*. 1994; 101: 439-447.
151. Edmonds CR, Wung SF, Husz MJ, Pemberton B. Corneal endothelial cell count in keratoconus patients after contact lens wear. *Eye Contact Lens*. 2004; 30: 54-58.
152. Liu Z, Pflugfelder SC. The effects of long-term contact lens wear on corneal thickness, curvature, and surface regularity. *Ophthalmology*. 2000; 107: 105-111.
153. Yeniad B, Yilmaz S, Bilgin LK. Evaluation of the microstructure of cornea by in vivo confocal microscopy in contact lens wearing and non-contact lens wearing keratoconus patients. *Cont Lens Anterior Eye*. 2010; 33: 167-170.
154. González-Pérez J, Villa-Collar C, Sobrino Moreiras T, Lema Gesto I, González-Méijome JM, Rodríguez-Ares MT, Parafita M. Tear film inflammatory mediators during continuous wear of contact lenses and corneal refractive therapy. *Br J Ophthalmol*. 2012; 96: 1092-1098.
155. Kramann C, Boehm N, Lorenz K, Wehrwein N, Stoffelns BM, Pfeiffer N, Grus FH. Effect of contact lenses on the protein composition in tear film: a ProteinChip study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2011; 249: 233-243.
156. Acar BT, Vural ET, Acar S. Effects of contact lenses on the ocular surface in patients with keratoconus: piggyback versus ClearKone hybrid lenses. *Eye Contact Lens*. 2012; 38: 43-48.
157. Reim M, Schrage NF, Becker J. Interactions between ocular surface fluid and cornea related to contact lenses. *Eur J Ophthalmol*. 2001; 11: 105-115.

158. Kalsow CM, Reindel WT, Merchea MM, Bateman KM, Barr JT. Tear cytokine response to multipurpose solutions for contact lenses. *Clin Ophthalmol*. 2013; 7: 1291-1302.
159. Thakur A, Willcox MD. Contact lens wear alters the production of certain inflammatory mediators in tears. *Exp Eye Res*. 2000; 70: 255-259.
160. Ashby BD, Garrett Q, Willcox MDP. Corneal Injuries and Wound Healing – Review of Processes and Therapies. *Austin J Clin Ophthalmol*. 2014; 1: 2381-9162.
161. Balasubramanian SA, Pye DC, Willcox M. Effects of eye rubbing on the levels of protease, protease activity and cytokines in the tears: relevance in keratoconus. *Clin Exp Optom*. 2013; 96: 214-218.
162. Tuft SJ, Moodaley LC, Gregory WM, Davison CR, Buckley RJ. Prognostic factors for the Progression of keratoconus. *Ophthalmology*. 1994; 101: 439-447.
163. Steinberg J, Katz T, Lücke K, Frings A, Druchkiv V, Linke SJ. Screening for keratoconus with new dynamic biomechanical in vivo scheimpflug analyses. *Cornea*. 2015; 34: 1404-1412.
164. Mato JL, Lema I, Díez-Feijoo E. Videokeratoscopic indices in relation to epidemiological exposure to keratoconus. *Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2010; 248: 991-998.
165. Yue Shi. Strategies for improving the early diagnosis of keratoconus. *Clinical Optometry*. 2016; 8: 13–21.
166. Hashemi H, Beiranvand A, Yekta A, Maleki A, Yazdani N, Khabazkhoob M. Pentacam top indices for diagnosing subclinical and definite keratoconus. *Journal of Current Ophthalmology*. 2016; 28: 21-26.
167. Pantanelli S, MacRae S, Jeong TM, Yoon G. Characterizing the wave aberration in eyes with keratoconus or penetrating keratoplasty using a high-dynamic range wavefront sensor. *Ophthalmology*. 2007; 114: 2013–2021.
168. Maeda N, Fufikado T, Kurado T, Mihashi T, Hirohara Y, Nishida K, Watanabe H, Tano Y. Wavefront aberrations measured with Hartmann-Shack sensor in patients with keratoconus. *Ophthalmology*. 2002; 109: 1996-1903.
169. Saad L, Gatinel D. Evaluation of total and corneal wavefront high order aberrations for the detection of forme fruste keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012; 53: 2978-2992.
170. Kosaki R, Maeda N, Bessho K, Hori Y, Nishida K, Suzaki A, Hirohara Y, Mihashi T, Fujikado T, Tano Y. Magnitude and orientation of zernike terms in patients with keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007; 48: 3062-3068.
171. Uçakhan ÖÖ, Çetinkor V, Özkan M, Kanpolat A. Evaluation of Scheimpflug imaging parameters in subclinical keratoconus, keratoconus, and normal eyes. *J Cataract Refract Surg*. 2011; 37: 1116–1124.

172. Jafarinasab MR, Shirzadeh E, Feizi S, Karimian F, Akaberi A, Hasanpour H. Sensitivity and specificity of posterior and anterior corneal elevation measured by Orbscan in diagnosis of clinical and subclinical keratoconus. *J Ophthalmic Vis Res.* 2015; 10: 10–15.
173. Li Y, Meisler D, Tang M, Lu AT, Thakrar V, Reiser BJ, Huang D. Keratoconus diagnosis with optical coherence tomography pachymetry mapping. *Ophthalmology.* 2008; 115: 2159-2166.
174. Auffarth G, Wang L, Völcker H. Keratoconus evaluation using the Orbscan Topography System. *J Cataract Refract Surg.* 2000 ;26 :222-228.
175. Gros-Otero J, Arruabarrena-Sánchez C, Teus M. Central corneal thickness in a healthy Spanish population. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2011; 86: 73-76.
176. Nakagawa T, Maeda N, Kosaki R, Hori Y, Inoue T, Saika M, Mihashi T, Fujikado T, Tano Y. Higher-order aberrations due to the posterior corneal surface in patients with keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009; 50: 2660-2665.
177. Gherghel D, Hosking SL, Mantry S, Banerjee S, Naroo SA, Shah S. Corneal pachymetry in normal and Keratoconic eyes: Orbscan II versus ultrasound. *J Cataract Refract Surg.* 2004; 30: 1272-1277.
178. Lema I, Romero P, Mato JL, Feijóo ED. Corneal Descriptive Indices in the Fellow Eye of Unilateral Keratoconus. *Eye & Contact Lens.* 2009; 35: 65-68.
179. Fontes BM, Ambrósio R, Salomão M, Velarde GC, Nosé W. Biomechanical and tomographic analysis of unilateral keratoconus. *J Refract Surg.* 2010; 26: 677-681.
180. Reinstein DZ, Archer TJ, Gobbe M. Corneal epithelial thickness profile in the diagnosis of keratoconus. *J Refract Surg.* 2009; 25: 604-610.
181. Wang Z, Chen J, Yang B. Posterior corneal surface topographic changes after laser in situ keratomileusis are related to residual corneal bed thickness. *Ophthalmology.* 1999; 106: 406-410.
182. Kamiya K, Oshika T, Amano S, Takahashi T, Tokunaga T, Miyata K. Influence of excimer laser photorefractive keratectomy on the posterior corneal surface. *J Cataract Refract Surg.* 2000; 26: 867-871.
183. McMonnies CW. Inflammation and keratoconus. *Optom Vis Sci.* 2015; 92: 35-41.
184. Galvis V, Sherwin T, Tello A, Merayo J, Barrera R, Acera A. Keratoconus: an inflammatory disorder?. *Eye.* 2015; 29: 843-859.
185. Ortak H, Sogut E, Tas U, Mesci C, Mendil D. The relation between keratoconus and plasma levels of MMP-2, zinc, and SOD. *Cornea.* 2012; 31: 1048-1051.
186. Karaca EE, Özmen MC, Ekici F, Yüksel E, Türkoğlu Z. Neutrophils-to-lymphocyte ratio may predict progression in patients with keratoconus. *Cornea.* 2014; 33: 1168-1173.

187. Wisse RP, Kuiper JJ, Gans R, Imhof S, Radstake TR, Van der Lelij A. Cytokine expression in keratoconus and its corneal microenvironment: a systematic review. *Ocul Surf*. 2015; 13: 272-283.
188. Toprak I, Kucukatay V, Yildirim C, Kilic-Toprak E, Kilic-Erkek O. Increased systemic oxidative stress in patients with keratoconus. *Eye*. 2014; 28: 285-289.
189. Hennessy EJ, Parker AE, O'Neill LA. Targeting toll-like receptors: emerging therapeutics?. *Nat Rev Drug Discov*. 2010; 9: 293-307.
190. Solomon A, Dursum D, Liu Z, Xie Y, Macri A, Pflugfelder SC. Pro- and anti-inflammatory forms of interleukin-1 in the tear fluid and conjunctiva of patients with dry-eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001; 42: 2283-2292.
191. Barton K, Monroy DC, Nava A, Pflugfelder SC. Inflammatory cytokines in the tears of patients with ocular rosacea. *Ophthalmology*. 1997; 104: 1868-1874.
192. Planck SR, Huang XN, Robertson JE, Rosenbaum JT. Cytokine mRNA levels in rat ocular tissues following systemic endotoxin treatment. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994; 35: 924-930.
193. Choi HJ, Kim MK, Ko JH, Lee HJ, Jeong HJ, Wee WR, Seong SY, Akira S. Effect of Toll-like receptors 2 and 4 of corneal fibroblasts on cytokine expression with co-culture antigen presenting cells. *Cytokine*. 2011; 56: 265-271.
194. Horner AA. Toll-like receptor ligands and atopy: a coin with at least two sides. *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 117: 1133-1140.
195. Kucuksezer UC, Palomares O, Rückert B, Jartti T, Puhakka T, Nandy A, Gemicioğlu B, Fahrner HB, Jung A, Deniz M. Triggering of specific toll-like receptors and proinflammatory cytokines breaks allergen-specific T-cell tolerance in human tonsils and peripheral blood. *J Allergy Clin Immunol*. 2013; 131: 875-885.
196. Oh JY, Choi H, Lee RH, Roddy GW, Ylöstalo JH, Wawrousek E, Prockop DJ. Identification of the HSPB4/TLR2/NF- κ B axis in macrophage as a therapeutic target for sterile inflammation of the cornea. *EMBO Mol Med*. 2012; 4: 435-448.
197. Bonini S, Micera A, Iovieno A, Lambiase A, Bonini S. Expression of toll-like receptors in healthy and allergic conjunctiva. *Ophthalmology*. 2005; 112: 1528-1534.
198. Gillette TE, Allansmith MR. Lactoferrin in human ocular tissues. *Am J Ophthalmol* 1980; 90: 30-37.
199. Dogru M, Karakaya H, Ozcetin H, Ertürk H, Yücel A, Özmen A, Baykara M, Tsubota K. Tera function and ocular surface changes in keratoconus. *Ophthalmology*. 2003; 110: 1110-1118.

200. Acera A, Vecino E, Rodríguez Agirretxe I, Aloria K, Arizmendi JM, Morales C, Duran JA. Change in tear protein profile in Keratoconus disease. *Eye*. 2011; 25: 1225-1233.
201. Kijlstra A. The role of lactoferrin in the nonspecific immune response on the ocular surface. *Reg Immunol*. 1990-1991; 3: 193-197.
202. Sack RA, Tan KO. Diurnal tear cycle: evidence for a nocturnal inflammatory constitutive tear fluid. *Invest. Ophthalmol Vis Sci*. 1992; 33: 626-640.
203. Kijlstra A, Jeurissen SH, Koning KM. Lactoferrin levels in normal human tears. *Br J Ophthalmol*. 1983; 67: 199-202.
204. McGill JL, Liakos GM, Goulding N, Seal DV. Normal tear protein profiles and age-related changes. *Br J Ophthalmol*. 1984; 68: 316-320.
205. Choi GS, Shin SY, Kim JH, Lee HY, Palikhe NS, Ye YM, Kim SH, Park HS. Serum lactoferrin level as a serologic biomarker for allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy*. 2010; 40:403-410.
206. Mackie IA, Seal DV. Diagnostic implications of tear protein profiles. *Br J Ophthalmol*. 1984; 68: 321-324.
207. Versura P, Nanni P, Bavelloni A, Blalock WL, Piazzzi M, Roda A, Campos EC. Tear proteomics in evaporative dry eye disease. *Eye*. 2010; 24: 1396-1402.
208. Rapacz P, Tedesco J, Donshik PC, Ballow M. Tear lysozyme and lactoferrin levels in giant papillary conjunctivitis and vernal conjunctivitis. *CLAO J*. 1988; 14: 207-209.
209. Ballow M, Donshik PC, Rapacz P, Samartino L. Tear lactoferrin levels in patients with external inflammatory ocular disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1987; 28: 543-545.
210. Jensen OL, Gluud BS, Birgens HS. The concentration of lactoferrin in tears during post-operative ocular inflammation. *Act Ophthalmol*. 1985; 63: 341-345.
211. Bron AJ, Mengher LS. The ocular surface in keratoconjunctivitis sicca. *Eye*. 1989; 3: 428-437.
212. Zabala M, Archila EA. Corneal sensitivity and topogometry in keratoconus. *CLAO J*. 1988; 14: 210-212.
213. Dartt DA. Neural regulation of lacrimal gland secretory processes: relevance in dry eye diseases. *Prog Retin Eye Res*. 2009; 28: 155-177.
214. Frust A, Veres A, Kizsel P, Nagy ZZ, Cervenak L, Csakany B, Maka E, Suveges I, Grus FH. Changes intear protein pattern after photorefractive keratectomy. *Eur J Ophthalmol*. 2003; 13: 525-531.
215. Teng CC. Electron microscope study of the pathology of keratoconus. *I Am J Ophthalmol*. 1963; 55: 18-47.
216. Brookes NH, Loh IP, Clover GM, Poole CA, Sherwin T. Involvement of corneal nerves in the progression of keratoconus. *Exp Eye Res*. 2003; 77: 515-524.

217. Balasubramanian SA, Pye DC, Willcox MD. Are proteinases the reason for Keratoconus?. *Curr Eye Res.* 2010; 35: 185-191.
218. Kenney MC, Brown DJ. The cascade hypothesis of keratoconus. *Cont. Lens Anterior Eye.* 2003; 26: 139-146.
219. Karamichos D, Zieske JD, Sejersen H, Sarker-Nag A, Asara JM, Hjortdal J. Tear metabolite changes in keratoconus. *Experimental Eye Research.* 2015; 132: 1-8.
220. Baker EN, Baker HM. A structural framework for understanding the multifunctional carácter of lactoferrin. *Biochimie.* 2009; 9: 3-10.
221. Puddu P, Latorre D, Valenti P, Gessani S. Immunoregulatory role of lactoferrin-lipopolysaccharide interactions. *Biometals.* 2010; 23: 387-397.
222. Appelmelk BJ, An YQ, Geerts M, Thijs BG, de Boer HA, MacLaren DM, de Graaff J, Nuijens JH. Lactoferrin is a lipid A-binding protein. *Infect Immun.* 1994; 62: 2628-2632.
223. Bournazou I, Mackenzie KJ, Duffin R, Rossi AG, Gregory CD. Inhibition of eosinophil migration by lactoferrin. *Immunology and Cell Biology.* 2010; 88: 220-223.
224. Tsuchiya S, Tanaka M, Konomi H, Hayashi T. Distribution of specific collagen types and fibronectin in normal and keratoconus corneas. *Jpn J Ophthalmol.* 1986; 30: 14-31.
225. Nishida T. Role of fibronectin in the corneal epithelial wound healing. In: Cavanagh HD, ed. *The Cornea Transactions of the World Congress on the Cornea III.* New York, Raven Press. 1988: 619-625.
226. Li J, Shen J, Beuerman RW. Expression of Toll-like receptors in human limbal and conjunctival epithelial cells. *Mol Vis.* 2007; 13: 813-822.
227. Chung SH, Kweon MN, Lee HK, Choi SI, Yang JY, Kim EK. Toll-like receptor 4 initiates an innate immune response to lipopolysaccharide in human conjunctival epithelial cells. *Exp Eye Res.* 2009; 88: 49-56.
228. Redfern RL, Barabino S, Baxter J, Lema C, McDermott AM. Dry eye modulates the expression of toll-like receptors on the ocular surface.. *Exp Eye Res.* 2015; 134: 80-89.
229. Saad A, Lteif Y, Azan E, Gatinel D. Biomechanical properties of keratoconus suspect eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010; 51: 2912-2916.



I) INTRODUCCIÓN

II) JUSTIFICACIÓN

III) HIPÓTESIS

IV) OBJETIVOS

V) MATERIAL Y MÉTODO

VI) RESULTADOS

VII) DISCUSIÓN

VIII) CONCLUSIONES

IX) REFERENCIAS

X) ANEXOS



ANEXOS

ANEXO I. LISTADO DE VARIABLES DEL ESTUDIO.

Fecha

Día	Mes	Año
<i>dd</i>	<i>mm</i>	<i>aaaa</i>

Datos del paciente

Nombre	Apellidos	Teléfono

Sexo

Hombre	Mujer
1	2

Grupo

Control	SC	QC
0	1	2

Fecha de nacimiento y edad

Fecha nacimiento			Edad
<i>dd</i>	<i>mm</i>	<i>aaaa</i>	

Agrupación por edad

10-20 años	21-30 años	31-40 años	41-50 años
1	2	3	4

Grupos por tiempo de diagnóstico (en caso de QC)

Inferior a 6 años	Entre 6 y 16 años	Mayor de 16 años
1	2	3

Enfermedades Generales Asociadas

No	Si	Tipo
0	1	

Enfermedades Oculares Asociadas

No	Si	Tipo
0	1	

Tratamientos Sistémicos

No	Si	Cuales
0	1	

Tratamientos Oculares

No	Si	Cuales
0	1	

Historia de QC (línea directa)

No	Si
0	1

Lateralidad SC

Ojo derecho	Ojo izquierdo
0	1

Lateralidad QC

Ojo derecho	Ojo izquierdo
0	1

Porte de LC

No	Si	Tipo LC
0	1	

Enfermedades alérgicas (alergia polen y ácaros, asma bronquial, rinitis, dermatitis atópica):

Atopia

No	Si	Grado	
0	1	Leve	Severa
		1	2

Picor ocular

No	Si	Grado	
0	1	Leve	Moderado
		1	2

Frotamiento ocular

No	Si	Grado	
0	1	Leve	Moderado
		1	2

Agudeza visual

Lejos			
0,9 - 1	0,8 - 0,7	0,6 - 0,4	0,4 - 0,05
1	2	3	4

Cilindro de corrección óptica

$\leq 1,5$ D	1.75 D – 3.00 D	3,25 D – Over cyl
0	2	3

Biomicroscopia (nervios corneales), Control y SC

No	Si
0	1

Tipos de signo en QC

Nervios corneales visibles	1
Estrías de Vogt	2
Anillo de Fleisher	3
Leucomas QC	4
Varios signos	5

Hiperemia conjuntival

No	Si	Escala de Efron (valores de 0 a 4)
0	1	

Tipos de signo en QC

Oval/zona de encurvamiento	1
Pajarita asimétrica	2
Globo	3
Pezón	4
Patrón en D	5
Patas de cangrejo	6

Topografía corneal

PDC (sim K)	D
K1	D
K2	D
Kmax	D
I-S	mm

Aberrometría

RMS	
Coma	Coma like

Clasificación Queratométrica de CLEK

Leve ($K_2 < 45D$)	Moderado ($K_2 \ 45-52D$)	Avanzado ($K_2 > 52D$)
1	2	3

Orbscan II

Elevación posterior (mm)	
Paquimetría central (μm)	
Pto min. Grosor (μm)	
KPI (%)	

Clasificación de Krumeich

	PDC	RMS	SIGNOS	ESPEJOR CENTRAL
Estadio I	$\leq 48 \text{ D}$	1,5 y 2 μm	Ausencia de cicatriz	
Estadio II	$> 48 \leq 53 \text{ D}$	2,5 y 3,5 μm	Ausencia de cicatriz	$> 400 \mu\text{m}$
Estadio III	$> 53 \leq 55 \text{ D}$	3,5 y 4,5 μm	Ausencia de cicatriz	$> 300 \leq 400 \mu\text{m}$
Estadio IV	$> 55 \text{ D}$	$> 4,5 \mu\text{m}$	Cicatriz corneal	$> 200 \mu\text{m}$

Estudio de la lágrima

Test de Schirmer (mm)	Tiempo (min)

TLRs (células epiteliales)

CÓRNEA	
TLR2	TLR4

CONJUNTIVA	
TLR2	TLR4

Lágrimas (estudio molecular)

Lf	cFn